

CARCINOSTATIC ACTION REGULATOR

Patent number: JP63099017
Publication date: 1988-04-30
Inventor: AMAGASE HARUNOBU; others: 02
Applicant: WAKUNAGA PHARMACEUT CO LTD
Classification:
- international: A61K37/02; A61K37/24; A61K37/26
- european:
Application number: JP19860278190 19861121
Priority number(s):

BEST AVAILABLE COPY**Abstract of JP63099017**

PURPOSE: To obtain the titled regulator, containing a growth factor and a peptide corresponding to part of constituent ingredients thereof as an active ingredient and capable of enhancing the anticancer action of a compound having the anticancer action and relieving side effects thereof.

CONSTITUTION: An anticancer action regulator containing a growth factor such as epithelial cell growth factor group, e.g. human epithelial cell growth factor (hEGF), insulin group, blood platelet-derived growth factor group, e.g. fibroblastic growth factor, etc., and a peptide corresponding to part of constituent ingredients thereof, derivative or salt thereof as an active ingredient. A derivative in which methionine at the 21st residue from the N-terminal is converted into leucine in 53 amino acid residues constituting the hEGF, two of leucine and arginine deficient in the C-terminal, etc., are cited as the above-mentioned derivative. The dose of the above-mentioned regulator is preferably about 10ng-10mg expressed in terms of the growth factor, etc., a day for an adult and the regulator is also effectively used as a radiosensitizer in radiotherapy.

Data supplied from the esp@cenet database - Patent Abstracts of Japan

⑫ 公開特許公報(A)

昭63-99017

⑬ Int.Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 昭和63年(1988)4月30日

A 61 K 37/02
37/24
37/26ADU
ADU
ADU8615-4C
8615-4C
8615-4C

審査請求 未請求 発明の数 1 (全35頁)

⑮ 発明の名称 制ガン作用調節剤

⑯ 特 願 昭61-278190

⑰ 出 願 昭61(1986)11月21日

優先権主張 ⑱ 昭60(1985)11月28日 ⑲ 日本(JP) ⑳ 特願 昭60-268175

㉑ 昭61(1986)5月21日 ㉒ 日本(JP) ㉓ 特願 昭61-116558

㉔ 発 明 者 天ヶ瀬 晴信 広島県高田郡甲田町下甲立1624 湧永製薬株式会社中央研究所内

㉕ 発 明 者 荒川 正人 広島県高田郡甲田町下甲立1624 湧永製薬株式会社中央研究所内

㉖ 発 明 者 橋本 健 広島県高田郡甲田町下甲立1624 湧永製薬株式会社中央研究所内

㉗ 出 願 人 湧永製薬株式会社 大阪府大阪市福島区福島3丁目1番39号

㉘ 代 理 人 弁理士 佐藤 一雄 外2名

明 細 書

1. 発明の名称

制ガン作用調節剤

2. 特許請求の範囲

1. 成長因子、その構成成分の一部に相当するペプチド、これらの誘導体、またはこれらの塩を有効成分とすることを特徴とする制ガン作用調節剤。

2. 成長因子が、上皮細胞成長因子族、インスリン族、または血小板由来成長因子族である、特許請求の範囲第1項記載の制ガン作用調節剤。

3. 成長因子が上皮細胞成長因子族である、特許請求の範囲第1項記載の制ガン作用調節剤。

4. 上皮細胞成長因子族が、ヒト上皮細胞成長因子(hEGF)、hEGFを構成するアミノ酸53残基中N末端から21番目のメチオニンがロイシンに交換されたもの([Leu²¹]

hEGF)、hEGFを構成するアミノ酸53残

基中C末端からロイシンおよびアルギニンの2個がないもの、(hEGF-II)、α型トランスフォーマー成長因子(TGF_α)、またはβ型トランスフォーマー成長因子(TGF_β)である、特許請求の範囲第3項記載の制ガン作用調節剤。

5. 成長因子がインスリン族である、特許請求の範囲第1項記載の制ガン作用調節剤。

6. インスリン族がインスリン、インスリン様成長因子I型(IGF-I)、またはインスリン様成長因子II型(IGF-II)である、特許請求の範囲第5項記載の制ガン作用調節剤。

7. 成長因子が血小板由来成長因子族である、特許請求の範囲第1項記載の制ガン作用調節剤。

8. 血小板由来成長因子族が繊維芽細胞成長因子(PGF)である、特許請求の範囲第7項記載の制ガン作用調節剤。

3. 発明の詳細な説明

〔発明の背景〕

技術分野

本発明は制ガン作用調節剤に関する。さらに詳細には、本発明は、成長因子、その構成成分の一部に相当するペプチド、これらの誘導体またはこれらの塩（以下「成長因子等」ということがある）を有効成分とする制ガン作用調節剤に関するものである。

先行技術

成長因子 (Growth factor) とは、「In vivo または In vitro において動物細胞の成長を促進するものであって栄養物質でないもの」であり

〔Ann.Rev.Biochem., 45, 531-558(1976)〕、従来のホルモンやその担体なども成長因子の範囲に入る。

このような因子は、現在、約40種類知られており、主な成長因子としては、例えばインスリン族に分類されるもの（インスリン、インスリン様成長因子〔IGF-I、IGF-II等〕、乳腺刺

は、1975年にコーエン (S.Cohen) らにより人尿中から単離された上皮組織の増殖角化を促進するヒト由来の因子として紹介され〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72, 1317(1975)〕また同年グレゴリー (H.Gregory) らによって人尿中から単離された胃酸分泌抑制作用をもつヒトウロガストロン (human Urogastrone:h-UG) として紹介された〔Nature, 257, 325(1975)〕ポリペプチドと同一物質であって、分子量が約6000で53残基のアミノ酸よりなっていてその分子中に3本のジスルフィド結合を有するポリペプチド〔代謝、17, 51~58(1980)〕であるということが現在わかっている（以下、上皮細胞成長因子をEGFと記す）。

そして、EGFの生理活性および薬理活性として現在までに報告されているものは、胃酸分泌抑制作用〔Gut, 16, 1887(1975)、Ibid., 23, 951(1982)〕、抗潰瘍作用〔Gut, 22, 927(1981)、Brit. J. Surg., 84, 830(1977)〕、消化管粘膜保護作用〔特開昭60-9686号明細書〕、DNA合成促進作用〔Gut, 22, 927(1981)、J. Physiol., 325,

激因子〔MSF〕、神経成長因子〔NGF〕等）、上皮細胞成長因子族（上皮成長因子族ともいう）に分類されるもの（上皮細胞成長因子〔上皮成長因子とも言う、EGF〕、トランスフォーミング成長因子類〔TGF α 、TGF β 、TGF γ 等〕、血小板由来成長因子族に分類されるもの（血小板由来成長因子〔PDGF〕、骨肉腫由来成長因子〔ODGF〕、繊維芽細胞成長因子〔FGF〕等）その他（コロニー形成刺激因子〔CSF〕、T細胞増殖因子、腫瘍血管新生因子〔TAF〕、DNA合成促進因子〔DSF〕、腫瘍由来成長因子類、繊維芽細胞由来成長因子〔FDGF〕等）がある。

これらの成長因子のうち、上皮細胞成長因子はヒトや馬の尿中からも、ウサギ、ラットおよびマウスの顎下腺からも単離され、哺乳動物中にその種を越えて存在していることが知られている

〔Adv. Metab. Dis., 8, 265(1975)、特開昭56-25112号公報等〕。なかでも、ヒト上皮細胞成長因子 (human Epidermal Growth Factor:hEGF)

35(1982)〕、角膜修復作用〔特開昭59-65020号公報〕、カルシウム遊離促進作用〔Endocrinology, 107, 270(1980)〕、創傷治癒促進作用〔Plast. Reconstr. Surg., 64, 766(1979)、J. Surg. Res., 33, 164(1982)〕、抗炎症作用〔特開昭60-115784号公報〕、および鎮痛作用〔特開昭60-115785号公報〕等がある。

ところで、一般的に、成長因子類は生体内（これを「In vivo」と略記する）において、特殊な条件下であるが、発ガンプロモーター作用を有することが報告されている。例えば、本発明の有効成分のひとつであるEGFについてそのような報告がある〔Surgical Forum 16, 108(1965)、Excerpta Medica 32(7), 913-915(1976)、Science 201, 515-518(1978)、Cancer Res. 39, 239-243(1979)〕。

一方、試験管内（これを「In vitro」と略記する）では、成長因子類の受容体を有するガン細胞は、成長因子類の添加によってむしろ増殖が抑制されるのはよく知られたところであり、具体的に

は、EGF受容体を持ったガン細胞の増殖がEGFの添加によってむしろ抑制されるという報告がある〔J.Biol.Chem., 259, 7761-7766(1984)、トキシコロジーフォーラム 9(1), 55-82(1986)〕。また、抑制されないまでもEGFを添加しても単独では細胞増殖が全く促進されないという報告もある〔Int.J.Cell Cloning, 3, 407-414(1985)〕。

一方現在わが国では、「ガン」は死亡原因の第一位に位置しており、このガンの治療も種々行われている。ガンの治療法には、外科的療法、放射線療法、化学療法等があり、前二者は局所的な療法である。局所的な療法はガンが原発巣以外に転移している場合には極めて適用困難な療法であるところから、このような場合は制ガン剤などを用いる化学療法に頼らざるを得ない。しかしながら、この方法で使用する制ガン剤は、制ガン効果の強いものは副作用も強いのがふつうであって、この点で化学療法にも限界があると言えよう。

現在、制ガン剤として用いられているものには、アルキル化剤（ナイトロジェンマスタード・N・

オキシド、トリエチレンメラミン、ブスルファン、カルムスチン、ダカルバジン等）、代謝拮抗剤（メソトレキセート、6-メルカプトプリン、5-フルオロウラシル〔5-FU〕、シトシンアラビノシド〔Ara-C〕、サイクロサイチジン等）、抗生物質（アドリマイシン〔ドクソルビシン〕、アクチノマイシンC、アクチノマイシンD、クロモマイシンA₃、ブレオマイシン等）、植物アルカロイド（ビンクリスチン、デメコルチン等）、プロスタグランジン類、免疫賦活剤（ビシパニール[®]、クレスチン[®]等の多糖類）、白金製剤（シスプラチンなど）、リンホカイン、モノカイン類（インターフェロン、インターロイキン-2等）などがある。

また、代謝拮抗剤には、上記とは別の問題、例えば5-フルオロウラシル〔A Comprehensive Treatise, 5, 327, New York, Plenum Press, Cancer Res 18, 478(1958), Gastroenterology, 48, 430(1965), Cancer Treat. Rep., 62, 533(1978) J. Natl. Cancer Inst., 22, 497(1959)〕は、細胞分裂のさ

やかな消化管粘膜や骨髄などに作用して下痢や白血球の減少を引き起こす等の副作用が報告されており〔Pharmacological Principles of Cancer Treatment, 195(1982)〕、他の上記制ガン剤についても種々の副作用があることが知られている〔成書「図説 薬理学」p 384~385、朝倉書店（1979年刊）〕。

他方、放射線療法についてもガン治療の一環として治療成績の向上を図る方法がなされている。このような方法として、例えば加速された重イオン粒子を照射したり、 π 中間子を用いる手段によって物理的線量分布を向上させる方法などがある。しかしながら、これらの方法では、その実施に必要な加速器や付属施設等に費用がかかるうえ、多くの熟練した技術者や医師をも必要とする。さらに、放射線療法は、正常組織に対する損傷が大きいなどの欠点も付随する。

従って、このような問題点を解決すべく、制ガン作用が強く、しかも、副作用の少ない制ガン剤や制ガン作用を調節する薬剤の提供と、化学療法

やその他のガン治療法の有効な適用方法が望まれている。

〔発明の概要〕

要 旨

本発明は、上記問題点を解決することを目的とし、鋭意研究を重ねた結果、制ガン作用を有する化合物と成長因子等とを組合せると制ガン作用を有する化合物の制ガン作用が増強され、しかもその化合物の副作用も軽減されることを見出し、この知見をもとに新規な制ガン作用調節剤を完成し、これを提供することにより上記目的を達成しようとするものである。

従って、本発明による制ガン作用調節剤は、成長因子、その構成成分の一部に相当するペプチド（フラグメント）、これらの誘導体、またはこれらの塩を有効成分とすること、を特徴とするものである。

効 果

本発明の制ガン作用調節剤は上記成分を有効成分とするものであって、上記問題点を解決して制

ガン効果が増強し、しかも制ガン剤の副作用を低下させるという利点を有する。

従来より制ガン剤として使用され、あるいは制ガン作用を有する化合物として知られているものは、前記したように種々の副作用を有していた。しかしながら本発明は前記制ガン作用を有する化合物に、さらに成長因子等を加えると、これが上記化合物の制ガン作用を増強するとともに、その化合物の副作用をも抑制するというを確認してなされたということは前記した通りである。

従って、本発明の制ガン作用調節剤は、ガンの治療、特に化学療法、において有用であろう。

また、放射線療法や温熱療法といった化学療法以外の治療方法の治療効果を高める目的で本発明薬剤を使用することも有益であろう(例えば特開昭57-67518号公報参照)。

なお、本発明の薬剤の有効成分である成長因子等は、それ自体有用な生理活性および薬理活性を有する。例えば、成長因子の一つであるEGFは、経口または非経口の投与形態で消化性潰瘍に対す

る治療効果(特開昭59-180270号公報)、消化管粘膜保護効果(特開昭60-9686号公報)、創傷治癒促進作用(Plast. Reconstr. Surg., 64, 766(1979)、J. Surg. Res., 33, 164(1982))をあわせもつこと等が知られている。従って、成長因子等がこのように種々の作用をあわせもっていることから、これを有効成分としてなる本発明の薬剤は独特な治療が期待できよう。

[発明の具体的説明]

本発明の制ガン作用調節剤は、前記成分を有効成分とするものである。

本発明による薬剤は、制ガン作用を有する化合物に対してその制ガン作用を調節する(制ガン作用の増強および(または)その副作用の抑制ないし防止)ためのものである。

制ガン作用を有する化合物

本発明で「制ガン作用を有する化合物」とは、主としてガンの治療に用いることができる化合物であって、制ガン剤あるいは抗悪性腫瘍剤として用いられている薬物や、制ガン作用または抗悪性

腫瘍作用を有する化合物をいう。本発明によりその制ガン作用が増強されるべきこの化合物には、それが本来有している性質として制ガン作用を有する限り任意の化合物が含まれるが、既にこの作用が確認されているものを例に挙げれば以下のようなものがある。

1. アルキル化剤

例えば、クロロメチン類、ナイトロジエンマスタート類、エチレンイミノ類、アルキルスルホン酸類、ニトロソウレア類、エポキシド類等がある。

〔成書「がん化学療法」p10~33(1985) 南江堂刊〕。ここで、本発明において「~類」とは、これら化合物と骨格構造を共有し、活性を具備し得るものであって任意の置換ないし化学的な修飾を受けた誘導体およびその塩を含む概念である。

このような化合物の例として、ナイトロジエンマスタート類には、イペリット、ナイトロジエンマスタート・N-オキシド、シクロホスファミド(例えば特開昭58-41892号公報等)、メ

ルファラン、クロラムブシル、ウラシルマスタード、ドバン、アラニン・MN等がある。エチレンイミン類としては、トリエチレンメラミン、トリエチレンチオホスホラミド、カルバジルキノン、トレニモン等がある。ニトロソウレア類としてはカルムスチン、ロムスチン等がある。

2. 代謝拮抗剤

例えば、葉酸拮抗物質類(メソトレキセート、アミノプテリン等)、プリン拮抗物質類(6-メルカプトプリン、8-アザグアニン等)、ピリミジン拮抗物質類(5-フルオロウラシル〔例えば特開昭55-7231、同51-65774、同52-48677、同52-42887、同53-31676号公報等参照〕、テガフル、カルモフル等)等がある(前記成書「がん化学療法」p33~52参照)。また、最近上記テガフルとウラシルとの混合薬剤であるユーエフティ[®](UFT[®])も臨床的に用いられている。

3. 抗生物質

例えば、アクチノマイシン類(アクチノマイシ

ンC、D等)、アザセリン(Azaserine)、DON、ザルコマイシン(Sarkomycin)、カルジノフィリン(Carzinophilin)、マイトマイシン類(例えば特開昭60-67433号公報等)、クロモマイシンA₃類、プレオマイシン(例えば特開昭60-67425号公報等)、ペプロマイシン、ダウノルビシン(Daunorubicin)、アントラサイクリン系抗生物質であるアドリアマイシン(ドクソルビシン(Doxorubicin))(例えば特開昭60-178818号、同60-67425号公報等)、アクリルビシン(Aclarubicin)、等がある〔前記成書「ガン治療法」p52~p77参照〕。

4. ホルモン剤

例えば、性ホルモン剤類(テストステロン誘導体、エストラジオール誘導体等)、下垂体・副腎皮質系ホルモン剤類(コルチゾン、プレドニゾン、デキサメタゾン等)がある〔前記成書「がん化学療法」p77~88参照〕。

5. 植物性アルカロイド

デメコルシン(Demecolcin)、ビンブラスチン

(Vinblastine)、ビンクリスチン(Vincristine)、ポドフィロトキシン(Podophyllotoxin)等がある〔前記成書「がん化学療法」p89~97参照〕。

6. ポルフィリン系物質

ヘマトポルフィリン水銀錯塩、プロトポルフィリン・コバルト錯塩等がある〔前記成書「がん化学療法」p97参照〕

7. その他免疫賦活剤(クレスチン《PSK》、ビシパニール、レンチナンなど)、白金製剤(シスプラチン《例えば特開昭56-152415号公報等》、カルボプラチン、イプロプラチン等)〔「癌の化学療法1986」最新医学41(3)別冊p509-14(1986)最新医学社〕、その他リンホカイン、モノカイン類(インターフェロン、インターロイキン類、等)〔前記成書「がん化学療法」p98~105参照〕。

成長因子等

本発明で「成長因子」とは、*in vivo* または *in vitro* において動物細胞の成長を促進するものであって栄養物質でないものを指称し、従来のホル

モンやその担体なども成長因子の範疇に入るということは前記した通りである。

成長因子には、前記したように、上皮細胞成長因子族、インスリン族、血小板由来成長因子族などがあって、いずれも本発明の対象となるが、これらのうちで代表的なのは上皮細胞成長因子族のもの、たとえば上皮細胞成長因子(EGF)およびトランスフォーミング成長因子類(TGF)ならびにインスリン族のものたとえばインスリンやインスリン様成長因子(IGF-I、IGF-II)および血小板由来細胞成長因子族のものたとえば繊維芽細胞成長因子(FGF)である。

本発明は、天然に存在する上記成長因子そのもののみならず、それらの成長因子を構成するアミノ酸の任意の置換、アミノ酸付加もしくは欠如等の点で上記因子とは相違するが該成長因子と同様のあるいは類似の生理活性および薬理活性を有するもの、いわゆるフラグメントや誘導体、をも包含するものである。なお、ここで、誘導体として任意に置換し得るアミノ酸は、成長因子の活性を

具備し得る限りどのようなアミノ酸でもよく、置換するアミノ酸は天然のものであっても誘導体(アナログ(例えばケイ光性を具備するもの、脂溶性の高いもの等))であってもよい。

また、さらには、該成長因子の誘導体は、フラグメントの誘導体をも包含するものである。フラグメントとは少なくとも成長因子受容体との結合活性を有する部分のことであってもよく、該成長因子の一部の部分構造を有するものである。例えば、C末端やN末端からアミノ酸が1個あるいは2個以上欠けたものやあるいはC末端やN末端及び任意の部分から切断されてできたものでアミノ酸2個以上から成るものを包含する。

また、上記因子および上記のようなその誘導体のうちで末端のアミノ基およびカルボキシル基を化学修飾によって失っていない誘導体は、遊離のアミノ基およびカルボキシル基を持っているから、酸との塩および塩基との塩でもありうる。その場合には、製剤上許容される有機ないし無機の酸および塩基が一般に使用可能であり、具体的には、

たとえば、塩酸、硫酸、酢酸、マロン酸、コハク酸、水酸化ナトリウム、アミン類などを挙げることができる。

誘導体は、また、種々の化学修飾を施したものを包含するものである。このような誘導体は、たとえば、アルキル化、酸化、還元、水解等のそれ自体公知の化学修飾またはこれらの組合せによる化学修飾によって得られる。

従って、本発明は、上記成長因子そのもののみならず、それらの一部の部分構造を有するペプチド類（フラグメント）それらの誘導体ならびにそれらの塩をも包含するものである。

なお、これら成長因子等は、生体（具体的には、血液、唾液、尿、涙液、母乳各組織・臓器等）より抽出したり（成長因子やその誘導体等は、種々の方法により調製することができる（日本組織培養学会編「細胞成長因子」（1984年初倉書店発行）に収録されている文献参照））、化学合成、または遺伝子工学的合成手法等の任意の方法に従って調製することができる。このようにして調

製された成長因子等は、高純度であることが好ましい。

このような成長因子等の代表的なものとして、上皮細胞成長因子がある。上皮細胞成長因子は、前記したように、ヒトや馬などの尿中からも、ウサギ、ラットおよびマウス顎下腺からも単離され、哺乳動物中にその種を越えて存在していることが知られている〔Adv. Metab. Dis., 8, 265 (1975)、特開昭56-25112号公報等〕。なかでも、本発明の薬剤をヒトに適用する場合は、前記 h E G F が好ましい。そしてこの E G F の調製には、例えば生体成分より単離する方法〔特開昭58-99418号、同58-219124号、同59-204123号公報等、特公昭44-12744号、同53-4527号、同59-50315号、同59-50316号、同59-42650号公報等〕や化学的に合成する方法〔特開昭59-27858号公報等〕および遺伝子工学的的手法により造成する方法〔特開昭57-122096号、同58-216697号、同

59-132892号各公報等〕が提案されている。

そして、E G F の生理活性および薬理活性として現在までに報告されているものは、胃酸分泌抑制作用〔Gut, 18, 1887 (1975)、ibid., 23, 951 (1982)〕、抗潰瘍作用〔Gut, 22, 927 (1981)、Brit. J. Surg., 64, 830 (1977)〕、消化管粘膜保護作用〔特開昭-9686号明細書〕、DNA合成促進作用〔Gut, 22, 927 (1981)、J. Physiol., 325, 35 (1982)〕、角膜修復作用〔特開昭59-65020号公報〕、カルシウム遊離促進作用〔Endocrinology, 107, 270 (1980)〕、創傷治癒促進作用〔Plast. Reconstr. Surg., 64, 766 (1979)、J. Surg. Res., 33, 184 (1982)〕、抗炎症作用〔特開昭60-115784号公報〕、および鎮痛作用〔特開昭60-115785号公報〕等があることは前記した通りである。

一方、E G F 誘導体としては、遺伝子工学的手法により造成されたもの〔ヒト E G F (h E G F) を構成する53アミノ酸残基中N末端から21番

目をメチニオンのかわりにロイシンとしたもの〔(Leu²¹)-h E G F : 特開昭60-28994号公報〕が提案されている。他の E G F 誘導体として、h E G F のC末端が2個欠けたものであるh E G F - II も得られている〔本発明者らの共同研究者らによって提案された特願昭60-22630号の明細書参照。なお、ここで本発明者らの共同研究者らによって遺伝子工学的に調製されたh E G F は高純度（99.9%程度以上）であり、このように高純度なものであることは成分（ロ）として好ましい。〕。さらに他の E G F フラグメントとして、E G F のC末端が5個または6個欠けたものであるd e s - (49-53) - E G F (E G F - 5)、d e s - (48-53) - E G F (E G F - 6)〔Biochemistry, 15, 2624 (1976)、Mol. Pharmacol., 17, 314 (1980)、Vitam. Horm., 37, 69 (1979)、Clin. Res., 25, 312A (1977)〕、E G F がその種々の作用を発現するための最小単位と考えられるE G F - (20-31) やその誘導体である〔(A c m)

Cys^{20,31}) EGF-(20-31) (Proc. Natl. Acad. Sci., 81, 1951(1984) や [Ala²⁰] EGF-(14-31) (Proc. Natl. Acad. Sci., 81, 1951(1984))、臭化シアンによって処理することにより得られた誘導体である CNBr-EGF (Biochemistry, 15, 2824(1978)) なども知られており、このような物質も本発明の成長因子等の範疇に入るものとする。

成長因子の一群として上皮細胞成長因子族があって、その一例が上記のEGFおよびトランスフォーミング成長因子 (Transforming Growth Factor: TGF) であることは前記したところである。

このTGFは、EGFとアミノ酸配列に大きな相似部を持つものであって、現在は三つのクラスに分類されている。すなわち、TGF α 、TGF β および TGF γ である。TGF β は、TGF α あるいはEGFと相乗的に作用して細胞の成長を促進する。TGF γ は、単独でこの作用を発揮する。EGFとこの三種のTGFとは同じ

ものである。

制ガン作用調節効果

本発明の効果は、広汎なガンに対して成長因子等が制ガン作用を有する化合物の本来の制ガン効果を増強しあるいは(また)その制ガン剤の副作用を抑制ないしは防止するということからなるものである。

そのうち上記薬物の制ガン作用の増強効果は、従来より単独で制ガン剤として用いられている化合物と成長因子とを併用したときの、実験動物に移植されたガン細胞増殖抑制を指標として確認することができる。本発明においては、その一具体例としてN-メチル-N-ニトロソウレタンによって引き起こされたマウス結腸腺ガン (Colon adenocarcinoma 26 および Colon adenocarcinoma 38)、ヒト乳ガン等を実験動物マウスに移植し、本発明の薬剤の有効成分を投与したときのこのガン細胞増殖の抑制効果を調べること等により、上記作用を確認している。

また、上記化合物の副作用抑制ないし防止効果

成長因子族の範疇に属し、特にTGF α はEGFとアミノ酸配列の類似性が高く、TGF α の50残基中21残基までがEGFの相同の位置に見出されている (Proc. Natl. Acad. Sci., 81, 7363 (1984))。また、TGF α はEGFレセプターと結合し、これはEGFと競合する (「医学のあゆみ」133, 1040-1044 (1985))。さらに、TGF α はEGFレセプターキナーゼを活性化し (Nature, 292, 259(1981))、抗EGFレセプター抗体はTGF α のバラクリン作用を止める (J. Biol. Chem., 258, 11895(1984))。これらの事実から、EGFとTGFとは非常に近似した作用を有するものと解される。また、同様にインスリンとIGF類も、TGF α とEGFとの関係のように類似した作用があることが報告されている (Adv. Metab. Dis., 8, 203, 211, 237(1975)、Endocrinology, 107, 1451(1980))。そして、IGF類は、インスリン様活性以外にも成長因子活性をも具備している。本発明は、これらのように非常に近似した作用を有する同族の因子をも含

は、ガン細胞を移植された実験動物の体重減少を指標として確認することができる。なお、これら効果確認の詳細は後記実験例を参照されたい。

制ガン作用調節剤

本発明による制ガン作用調節剤は、前記「成長因子等」を有効成分とするものである。そして、本発明による制ガン作用調節剤は、前記有効成分と製剤上の補強成分とからなるのがふつうである。このうち補助成分として具体的なものには、担体 (賦形剤、結合剤、稀釈剤等)、安定剤、保存剤、溶解補助剤などがある。担体としては、たとえば炭酸カルシウム、乳糖、ショ糖、ソルビット、マンニット、デンプン、アミロペクチン、セルロース誘導体、ゼラチン、カカオ脂、水、パラフィン、油脂等がある。水、パラフィンおよび油脂の場合は、これは溶媒として作用する外に本発明制ガン作用調節剤をエマルジョンないしサスペンションの形にすることもある。

投与の剤形としては治療目的に応じて各種の形態を選択することができ、たとえば、粉末、顆粒、

微粒剤、錠剤、丸薬、カプセル剤、トローチ等の経口用剤や、坐剤、経鼻投与剤、ローション剤、注射剤（たとえば、殺菌した蒸溜水や種々の輸液等に本発明の活性物質を溶解または懸濁させる）、軟膏剤、パップ剤等の非経口用剤等の他、徐放性等の工夫を施したもの等投与可能な任意のものがあり得る。これらは、経口的または非経口的（注射を含む）に投与することができるうえ、必要に応じて他の薬剤を調合させてもよい。

制ガン作用を有する化合物と本発明薬剤との併用による化学療法の治療効果を増強する目的で本発明薬剤を使用するときには、制ガン作用を有する化合物の投与と同時あるいはその前後に投与する。本発明薬剤による効果増強対象とされる制ガン作用を有する化合物としては前記のようなものが例示される。

放射線療法の治療効果を高める目的で本発明薬剤を放射線増感剤として使用する場合には、放射線療法における放射線の照射前もしくは照射後あるいは事情が許せば照射中に投与する。放射線療

剤の併用にあって特に特殊な条件を設定する必要はなく、それぞれについて既知のものであることができる。すなわち、5-FUおよびアドリアマイシンの場合は、1日当りの注射投与量はそれぞれ5~15mg/kg体重程度および10~20mg/kg体重程度である。また、5-FUの成人の1日当りの経口投与量は、100~300mgである。

本発明の望ましい具体例は、この1日当りの投与量を1日1回ないし数回投与させるための単位投与形態のものである。

また、制ガン作用を有する化合物の投与と放射線の照射や温熱の付加などを併用するガンの治療に際して本発明薬剤を使用することもできる。

本発明による制ガン作用調節剤は、この調節剤ポリペプチドを、雌雄マウス、ラット各1群5匹に対して皮下注射で10mg/kg、静脈内注射で10mg/kgおよび経口投与で10mg/kg（ヒト血中EGF濃度の約100万倍に相当）を投与しても一般症状に変化がなく、また死亡例もないことにより、低毒性である。

法自体に関しては、特に特別な方法、条件を採用する必要はなく、一般の放射線療法技術をそのまま適用すればよい。本発明薬剤の併用により、従来より低線量域での放射線療法が可能である。

なお、放射線照射の線源としては、たとえばX線、リニアック高エネルギーX線、ベータトロン32MeV電子線、 ^{60}Co 線など一般線源でよい。

温熱療法の治療効果を高める目的で本発明の薬剤を温熱増感剤として使用する場合も、放射線療法と同様の投与方法に準ずる。なお、本発明を併用した温熱療法においては、特別な方法、条件等を採用する必要はなく一般の温熱療法技術をそのまま適用すればよい。

投与量は、患者の年齢、体重、病状等に応じて決めればよい。経口的及び非経口的（注射を含む）には通常成人の1日当りの成長因子等として10ng~10mg程度が望ましい。なお、本発明薬剤によってその作用を調節すべき制ガン作用を有する化合物の投与方法、投与量は、本発明薬

本発明による制ガン作用調節剤は制ガン作用を有する化合物を含まず、制ガン作用を有する化合物とは別に製剤化されているという点で同時特許願(1)に係る「制ガン剤」と異なる。

従って、本発明による制ガン作用調節剤は制ガン作用を有する化合物と同時に投与したり、制ガン作用を有する化合物を投与してから一定間隔において1~数回投与したりすることができる。なお、制ガン作用を有する薬物との同時投与ということは、両薬剤をそれぞれ適宜に製剤化しておき、両者を混合したものを投与する場合を包含するものとする。

実験事実

下記の実験事実、本発明をさらに具体的に説明するためのものである。実験例は制ガン作用の調節に関するものであり、実施例は製剤に関するものである。これらは例示であって、本発明はこれらによって制限を受けるものではない。

なお、実験例では、制ガン作用を有する化合物と成長因子等を併用する際に、個別に注射しても

(別注)、混合して注射しても(混注)も同様の結果が得られているので、併用投与は別注の結果で示すものとする。また、実施例で日局製剤規則：注射剤の製法に従って等張でないものに対しては、必要に応じて等張化を行ってもよい。

実験例1

代謝拮抗剤である5-FUとhEGFとを組合せて制ガン効果を調べた。

(1) 実験動物

BALB/c系マウスを恒温(23±0.5℃)、恒湿(60±5%)室で1週間予備飼育したのち、健康と思われる体重18~20gのものを1群6~12匹として本実験に供した。

(2) 実験方法および結果

Colon adenocarcinoma 26 (マウス結腸腺ガン)を細切ミンスしたもの約0.1~0.2mlを細胞移植針(トロッカー)でマウス腹部皮下右側に移植した。移植6日後に、ガンの大きさ、すなわちガンの長径(a mm)および短径(b mm)、を測定して、下式によりガン重量を算出した(インスト

ラクション14 (Instruction 14) (NCI)1980)。

$$\text{ガン重量 (mg)} = \frac{a b^2}{2}$$

(このガン腫瘍は一般に回転楕円体の形状をとるため、回転楕円体の体積計算の公式を導入した。また、ガン細胞の比重を約1として体積=重量とした)

なお、実験を始めるに当り、化合物投与直前にガン重量を測定し、各群間に実験開始時のガン重量の平均値に差が生じないように乱数表を用いてマウスを3群に分け、各群のガン重量の平均をそろえたのち、各々の群に化合物を投与した。

まず、本発明による制ガン作用増強効果をみるべく、従来より制ガン作用を有する化合物として常用されている5-FU 150 mg/kgを単独皮下投与した群、5-FU 150 mg/kgとヒトEGF (hEGF) 100 μg/kgとを併用皮下投与した群、および化合物無投与群において、移植ガン細胞の経時的重量変化を測定した。得られた結果は、第1図に示す通りであった。同図中、横軸は

化合物投与日を1日目とした実験日数を示し、縦軸はガン細胞増殖率を示すものであって、各々の群の第1日目のガン重量を100%としてこれに対する各日数経過時のガン重量の比率である。

また、図中各記号は以下の意味を示す。

↑
5-FU : 5-FU投与(皮下)

↑
hEGF : hEGF投与(皮下)

■ : hEGF + 5-FU併用投与群

● : 5-FU投与群

○ : 化合物無投与群

** : P < 0.01

* : P < 0.05

(*) : P < 0.1

(ただし、Pは5-FU単独投与群に対する統計学的有意性を考慮したときの危険率を示し、これらの値は全てスチューデント・ティー・テスト(Student's t-test)またはアスピナ・ウェルチの変法(Aspin-Welch method)による。)

なお、供試液は下記の通りである。

hEGF : 100 μg / 10 ml / kgとなるように
hEGFを溶媒(0.01% Tween
80を含む生理食塩水)に溶解したもの。

5-FU : 150 mg / 10 ml / kgとなるように
5-FUを溶媒(10%ジメチルスル
ホキシドを含む生理食塩水)に溶解したもの。

なお対照群(化合物無投与群)には、上記hEGFならびに5-FUの溶媒をいずれも投与した。

この結果、5-FUとhEGFとを併用投与した群において、化合物無投与群と比べてガン細胞増殖抑制効果がみられたばかりでなく、5-FU単独投与群に対しても顕著なガン細胞増殖抑制効果がみられ、5-FUの制ガン効果は著明に増強された。

実験例2

抗生物質系制ガン剤であるアドリアマイシンを用いて、上記実験例1と同様に制ガン作用増強効果を調べた。

実験方法および結果

実験は、実験例1と同様に行った。

ただし、被検液投与群は、アドリアマイシン 10 mg/kg を単独皮下投与した群、アドリアマイシン 10 mg/kg と h E G F 100 μg/kg とを併用皮下投与した群および化合物無投与群とした。

得られた結果は、第2図に示す通りであった。図中の記号は、下記の通りである。

▲ : h E G F + アドリアマイシン併用投与群

△ : アドリアマイシン投与群、

あとは前記と同じ。

被検液は、以下の通りであった。

h E G F : 実験例1と同じ。

アドリアマイシン : アドリアシン^R 注【協和醸造工業㈱】に 10 mg / 10 ml / kg となるように生理食塩水を加えて溶液として使用。

この結果より、アドリアマイシン 10 mg/kg と h E G F 100 μg/kg とを併用することによって、投与翌日から著明なガン増殖抑制効果が認め

なお、被検液は以下の通りであった。

インスリン : 50 μg / 10 ml / kg となるようにインスリンを溶媒 (0.005 N 塩酸を含む生理食塩水) に溶解したもの

5 - F U : 実験例1と同じ

この結果より、インスリン 50 μg/kg と 5 - F U 150 mg/kg とを併用することによって投与翌日から著明なガン増殖抑制効果が認められ、投与6日後までほぼ投与日と同程度のガンの大きさに抑えられた。5 - F U 単独投与群に比べると、この大きさは約半分程度であった。図中(※)、* などの印を付けたように、5 F U 単独投与群に比べて統計学的にも有意な持続的制ガン効果の増強作用が認められた。

実験例4

(1) 実験動物

C 5 7 B L / 6 系雄性マウスを恒温 (23 ± 0.5 °C、恒湿 (60 ± 5 %) 室で1週間予備飼育した後、健康と思われる体重 18 ~ 20 g のものを1群 10 ~ 20 匹として本実験に供した。

られ、投与9日後までにガン細胞はアドリアマイシン単独投与群の約3分の1程度の大きさにしかならず、統計学的に有意な持続的制ガン作用増強効果が認められた。

実験例3

次に、成長因子等のうちでインスリンを用いて前記実験例1と同様に制ガン作用増強効果を調べた。

実験方法および結果

実験は実験例1と同様に行った。

ただし、被検液投与群は、5 - F U 150 mg/kg を単独皮下投与した群、5 - F U 150 mg/kg とインスリン 50 μg/kg とを併用皮下投与した群、インスリン 50 μg/kg を単独皮下投与した群および化合物無投与群とした。

得られた結果は第3図に示す通りであった。図中の記号は、下記の通りである。

○ : 化合物無投与群

● : 5 - F U 投与群

■ : インスリン + 5 - F U 併用投与群

□ : インスリン投与群

(2) 実験方法および結果

Colon adenocarcinoma 38 (マウス結腸腺ガン) を細切ミンスしたもの約 0.1 ~ 0.2 ml を細胞移植針 (トロッカー) でマウス腹部皮下右側に移植した。移植 11 日後に、ガンの大きさ、すなわちガンの長径 (a mm) および短径 (b mm)、を測定し、下式により Colon 26 と同様にガン重量を算出した。

$$\text{ガン重量 (mg)} = \frac{a b^2}{2}$$

〔このガン腫瘍は一般に回転楕円体の形状をとるため回転楕円体の体積計算の公式を導入した。なお、ガン細胞の比重を約 1 として体積 = 重量とした。〕

実験を始めるに当り、化合物投与直前 (ガン移植後 11 日後) にガン重量を測定し、各投与群間に最初のガン重量の差が生じないように乱数表を用いてマウスを3群に分け、各群のガン重量の平均をそろえた後、各々の群に化合物を投与した。

本発明による成長因子の制ガン作用増強効果を

みるべく、従来より制ガン作用を有する化合物として禁用されている5-FU 150 mg/kgを単独皮下投与した群、5-FU 150 mg/gとhEGF 100 μ g/kgとを併用皮下投与した群、および化合物無投与群において上記実験を行った。得られた結果は、第1表に示す通りであった。

同表中、日数とは化合物投与日を1日目とした実験日数を示し、1日目の化合物投与直前のガン重量を100としている。各数値は例数10～20匹の平均値±標準誤差を示す。表中(#)、*および林の印は、5-FU単独投与群に対する併用投与群の統計学的有意差を示す(Pの定義は前記の通り)。

この結果より、hEGF+5-FU併用投与群では、投与後3日目以降、5-FU単独投与群に対していずれも有意なガン細胞増殖抑制が認められた。また、hEGFの代わりに[Leu²¹]-hEGFまたはhEGF-IIを用いて上記と同様の実験を行ったところ、同様の結果を得た。

第1表	投与群 日数	化合物無投与群		5-FU単独投与群		hEGF併用投与群 5-FU	
		100	100	100	100	100	100
	1	100	100	100	100	100	100
	2	194.9±58.1	106.3±31.8	60.3±10.3	39.3±11.4	39.3±11.4	39.3±11.4
	3	239.8±57.6	88.3±5.6	25.2±5.5	25.2±5.5	25.2±5.5	25.2±5.5
	4	232.5±15.5	84.5±7.0	42.0±11.3	42.0±11.3	42.0±11.3	42.0±11.3
	5	313.6±21.3	75.4±10.3	53.7±15.3	53.7±15.3	53.7±15.3	53.7±15.3
	6	415.6±24.2	86.2±9.5	59.0±14.3	59.0±14.3	59.0±14.3	59.0±14.3
	7	524.5±50.6	121.1±13.0	67.9±14.9	67.9±14.9	67.9±14.9	67.9±14.9
	8	621.2±62.0	147.3±16.0	76.5±15.6	76.5±15.6	76.5±15.6	76.5±15.6
	9	706.0±70.7	210.9±22.9				

実験例5

成長因子等の一つであるhEGFが、制ガン作用を有する化合物の副作用を軽減ないしは抑制する効果をみるべく、実験例1で以下のような測定を行った。

すなわち、実験例1において、実験動物の薬物投与直前の体重からガン重量を差し引いた値を100とし、この重量に対する薬物投与後の各日における実験動物の全体重からガン重量を差し引いた値の割合を算出して、第4図に示した。図中の記号は実験例1と同じである。

この結果より、5-FU単独投与では体重減少の抑制効果は認められなかったが、hEGFと5-FUとを併用した群は化合物無投与群や5-FUを単独投与した群と比較して統計的に有意な体重減少抑制効果がみられた。

実験例6

代謝拮抗剤系制ガン剤である5-FUを用いて、5-FUに耐性をもったマウス白血病の固型ガンに対するhEGF+5-FU併用の制ガン効果を、

ガン重量の増減を測定することにより検定した。

(1) 実験動物

CDF₁系雄性マウスを用いた。飼育条件等は実験例1と同じ。

(2) 実験方法および実験結果

P388(マウス白血病)のうちで5-FUに対して薬剤耐性をもつ株(P388/5-FU)を予めCDF₁マウスの腹腔内で増殖させた。腹腔内移植8日後に腹水(ガン細胞を含んでいる)を採取し、これを液体培地で希釈して、別のマウスにマウス1匹当り 3×10^6 cellsをマウス皮下部皮下に移植した。移植8日後にガンの大きさを実験例1(Colon 26)と同様の方法で測定し、ガン重量を算出した。

実験開始時のマウスの群分け操作は実験例1と同様に行った。

化合物の投与に関しても実験例1と同様に行った。ただし、投与回数は2回とし、1日目と3日目に投与した。

尚、被検液は以下の通りであった。

h E G F : 実験例1に同じ。

5 - F U : 実験例1に同じ。

得られた結果は、第2表に示す通りであった。

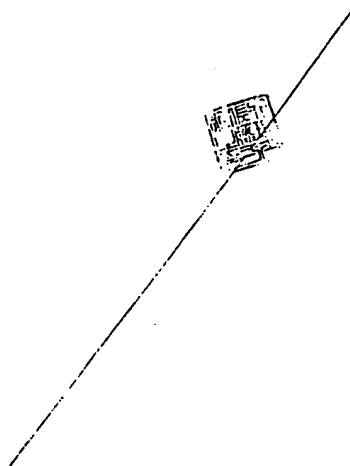
同表中、日数とは初回の化合物投与日を1日目とした実験日数を示し、1日目の化合物投与直前のガン重量を100としている。各数値は9匹の平均値±標準誤差を示す。表中(†)、* および#の印は、5 - F U単独投与群に対する併用投与群の統計学的有意差を示す(Pの定義は前記の通り)。

この結果により、h E G F + 5 - F U併用投与群は、投与翌日から5 - F U単独投与群および化合物無処置群に対して有意なガン細胞増殖抑制が認められた。

したがって、結腸ガンばかりでなく、白血病にも効果があったことから、h E G Fは多くのガンに対して著明な制ガン効果を示すであろうことは容易に考えられるところである。

また、さらに、本実験例で用いたマウス白血病P388は5 - F Uに対して耐性をもっており、

これに対して制ガン効果を認めたことは、薬剤耐性ができたガンに対しても有効な効果を示すであろうと思われる。



第2表	投与群 日数	化合物無処置群	5 - F U単独投与群	h E G F ₁ 併用投与群 5 - F U
	1	100	100	100
	2	147.4±15.1	126.2±5.5	105.0±6.6*
	3	227.9±16.1	232.7±15.9	154.1±14.1#
	4	266.8±32.6	280.0±31.7	180.4±23.2*

実験例7

h E G Fの誘導体でアミノ酸配列のN末端より21番目のメチオニン(Met)がロイシン(Leu)に置換された(Leu²¹) - h E G F、及びh E G Fのアミノ酸配列のうちC末端側のアミノ酸残基が2個欠けたフラグメントであるh E G F - IIを用いて、前記実験例6と同様の実験系で(Leu²¹) - h E G Fと5 - F Uの併用、及びh E G F - IIと5 - F Uの併用による制ガン効果をガン重量の増減を測定することにより検定した。

尚、h E G F - IIはh E G Fのフラグメントではあるが、その受容体の結合能や生物活性はh E G Fと同様である[J. Biol. Chem., 247, 7659(1972)]。

実験は、被検液投与群を、5 - F U 150 mg/kg単独皮下投与した群、5 - F U 150 mg/kgと(Leu²¹) - h E G F 100 μg/kgとを併用皮下投与した群、5 - F U 150 mg/kgとh E G F - II 100 μg/kgとを併用皮下投与した群お

よび化合物無処置群としたこと以外は実験例6と同様に行った。

尚、被検液は以下の通り。

(Leu²¹) - hEGF : 実験例1のhEGF
hEGF - II : と同様。

得られた結果は、第3表に示す通りであった。

同表中の記号は、第2表の説明に同じである。

この結果より、(Leu²¹) - hEGF + 5 - FU併用投与群及びhEGF - II + 5 - FU併用投与群では、hEGFと同様に、5 - FU耐性をもったガンに対して著明な制ガン効果がみられた。

第 3 表

投与群 日数	化合物無処置群	5 - FU単独投与群	(Leu ²¹) - hEGF) 併用投与群 5 - FU	hEGF - II) 併用 5 - FU 投与群
1	100	100	100	100
2	147. 4±15. 1	121. 2±10. 5	92. 0± 4. 8 [*]	94. 5± 5. 1 [*]
3	227. 9±16. 1	232. 7±15. 9	108. 3±18. 1 ^{**}	99. 8± 4. 8 ^{**}
4	268. 8±32. 6	280. 0±31. 7	160. 4±12. 3 ^{**}	180. 5±20. 4 [*]

実験例8

白金製剤系制ガン剤であるシスプラチンを用いて、実験例1と同様に制ガン作用増強効果を調べた。

実験は、被検液投与群をシスプラチン5mg/kgを単独皮下投与した群、シスプラチン5mg/kgとhEGF100μg/kgとを併用皮下投与した群および化合物無処置群としたこと以外は実験例1と同様に行った。

得られた結果は、第5図に示す通りであった。図中の記号は、下記の通りである。

- : シスプラチン投与群
- : hEGF + シスプラチン投与群

あとは前記と同じである。

尚、被検液は以下の通りであった。

hEGF : 実験例1と同じ。

シスプラチン : ランダ[®]注 (日本化薬株) 5mg/10ml/kgとなるように投与した。

この結果より、シスプラチン5mg/kgとhEGF100μg/kgとを併用することによって、投

得られた結果は、第6図に示す通りであった。

図中の記号および被検液は実験例8と同様である。

この結果より、比較的増殖速度の速いマウス結腸ガンのColon adenocarcinoma26ばかりでなく、増殖速度が遅くて増殖速度の点ではよりヒトのガンに近いColon adenocarcinoma38マウス結腸ガンに対しても投与翌日から著明なhEGFの併用効果が認められ、投与5日後までガン腫瘍の大きさは投与直前の大きさよりも小さいままであり、その大きさはシスプラチンを単独投与した群の約2/3程度であって、統計学的に有意な持続的制ガン作用が認められた。

なお、hEGFの代わりに(Leu²¹) - hEGFを用いて上記と同様の実験を行ったところ、同様の結果が得られた。

実験例10

抗生物質系制ガン剤であるアドリアマイシンを用いて、上記実験例2と同様にhEGFの誘導体である(Leu²¹) - hEGFの制ガン作用増強効果を調べた。

与翌日から著明なガン増殖抑制効果が認められ、投与6日後までにガン腫瘍はシスプラチン単独投与群及び化合物無処置群の約半分程度にしか大きくなっておらず、統計学的に有意な持続的制ガン作用増強効果が認められた。

尚、消化器系のガンは、シスプラチンに対して非感受性であるのが一般的である。本実験は、本来シスプラチン非感受性の消化器ガンをhEGFがシスプラチン感受性に転換しうる事を示したものである。

なお、hEGFの代わりに(Leu²¹) - hEGFを用いて上記と同様の実験を行ったところ、同様の結果が得られた。

実験例9

実験例4と同様に白金製剤系制ガン剤であるシスプラチンとhEGFとを組合せて、マウス結腸ガンcolon adenocarcinoma38に対する制ガン作用増強効果を調べた。

実験方法は実験例4と、被検投与群は実験例8と、同様である。

実験は、被検液投与群としてアドリアマイシンを10mg/kg単独皮下投与した群、さらに別途に、アドリアマイシン10mg/kgと(Leu²¹) - hEGF100μg/kgとを併用皮下投与した群、および化合物無投与群とした以外は実験例2と同様に行った。

得られた結果は、第7図に示す通りであった。図中の記号は、下記の通りである。

- ▲ : (Leu²¹) - hEGF + アドリアマイシン併用投与群

- △ : アドリアマイシン投与群

あとは前記と同じ。

この結果より、アドリアマイシン10mg/kgと(Leu²¹) - hEGF100μg/kgとを併用投与することにより、投与翌日から著明なガン増殖抑制効果が認められ、投与9日後でも投与日の約1.5倍にしか増えていなかった。これに対して、アドリアマイシン10mg/kgを単独皮下投与したところ、投与9日後では投与日の約5倍近くにまで達しており、化合物無投与群に比べると若

干の制ガン効果はみられるものの、(Leu²¹)
・hEGFを併用投与した時は強いものではな
かった。

(Leu²¹)・hEGFとアドリアマイシンを
併用投与した群では、アドリアマイシンを単独投
与した群のガン重量に対して統計学的にも有意な、
かつ持続的制ガン作用増強効果が認められた。

実験例 1.1

抗生物質系制ガン剤であるアドリアマイシンを
用いてヒト乳ガンに対するhEGF制ガン作用増
強効果を調べた。

なお、制ガン作用はガン重量の増減を測定する
ことにより検定した。

(1) 実験動物

BALB/c AJcl-nu系雄性ヌードマ
ウスを恒温(23±0.5℃)、恒湿(60±5
%)に保った無菌的クリーンラックで1週間予備
飼育したのち、健康と思われる体重20g前後の
ものを1群8匹として本実験に供した。以後の本
実験において用いたマウスは上記環境にて飼育し

みるべく、従来より制ガン作用を有する化合物と
して繁用されているアドリアマイシン10mg/kg
を単独皮下投与した群、アドリアマイシン10mg
/kgとhEGF100μg/kgとを併用投与した
群および化合物無投与群についてガン重量を測定
した。得られた結果は、第4表に示す通りであっ
た。同表中、日数とは初回の化合物投与日を1
日目とした実験日数を示し、1日目の化合物投与
直前のガン重量を100としている。

尚、化合物の投与は1日目、8日目、10日目、
13日目の合計4回行った。被検液は、以下の通
りであった。

hEGF：実験例1に同じ。

アドリアマイシン：実験例2に同じ。

各数値は、例数8匹の平均値±標準誤差を示す。
表中林の印は、アドリアマイシン単独投与群に対
して併用投与群のガン重量が、統計学的に有意に
抑制されたことを示す(Pの定義は前記の通り)。

この結果より、hEGF+アドリアマイシン併
用投与群は、投与後4日以降、アドリアマイシ

た。

(2) 実験方法および結果

MX-1(ヒト乳ガン)を1mm角程度に切断し
たものを細胞移植針(トロッカー)でマウス腋下
右側皮下に移植した。移植17日後に、ガンの大
きさ、すなわち、ガンの直径(a mm)および短径
(b mm)を測定し、下式によりColon 26と同様
にガン重量を算出した。

$$\text{ガン重量 (mg)} = \frac{a b^2}{2}$$

(このガン腫瘍は一般に回転楕円体の形状をとる
ため、回転楕円体の体積計算の公式を導入した。
尚、ガン細胞の比重を約1として体積=重量とし
た。)

実験を始めるに当り、化合物投与直前(ガン移
植後17日後)にガン重量を測定し、各投与群間
に最初のガン重量の差が生じないように乱数表を
用いてマウスを3群に分け、各群のガン重量の平
均をそろえた後、各々の群に化合物を投与した。

本発明による成長因子の制ガン作用増強効果を

単独投与群に対して有意な、かつ持続的なガン
細胞増殖抑制が認められた。

すなわち、マウスの実験腫瘍ばかりでなくヒト
ガンに対してもhEGFと制ガン剤を併用すると
制ガン効果の増強作用が認められた。

したがって、本剤はヒトのガンに対しても有益
な薬剤となりうるであろうことは容易に考えられ
るところである。

特許
第1312号

第 4 表	投与群 日数	化合物無処置群			アドリアマイシン		アドリアマイシン + hEGF	
		100	100	100	単独投与群	併用投与群	単独投与群	併用投与群
	1	100	100	100	100	100	100	100
	4	187.9 ± 7.8	162.0 ± 5.4	130.0 ± 7.7 [#]	162.0 ± 5.4	130.0 ± 7.7 [#]	130.0 ± 7.7 [#]	130.0 ± 7.7 [#]
	7	356.0 ± 24.9	221.8 ± 20.1	160.2 ± 17.7 [*]	221.8 ± 20.1	160.2 ± 17.7 [*]	160.2 ± 17.7 [*]	160.2 ± 17.7 [*]
	11	564.2 ± 51.4	291.8 ± 21.3	201.8 ± 13.9 [#]	291.8 ± 21.3	201.8 ± 13.9 [#]	201.8 ± 13.9 [#]	201.8 ± 13.9 [#]
	14	742.6 ± 90.3	256.9 ± 12.7	99.5 ± 9.3 [#]	256.9 ± 12.7	99.5 ± 9.3 [#]	99.5 ± 9.3 [#]	99.5 ± 9.3 [#]

得られた結果は、第5表に示す通りであった。

同表中、日数とは、化合物投与口を1日目とした実験口数を示し、1日目の化合物投与直前のガン重量を100としている。各数値は6~12匹の平均値±標準誤差を示す。表中(*)、*および#の印は、5-FU単独投与群に対する併用投与群の統計学的有意差を示す(Pの定義は前記の通り)。

この結果より、hEGF-Ⅱ+5-FU併用投与群は、投与後翌日から、5-FU単独投与群のガン重量に対していずれも有意な、かつ持続的なガン細胞抑制が認められた。

なお、アドリアマイシンの代わりにマイトマイシンC、シスプラチンを用い、これら各々とhEGF、(Leu²¹)-hEGF、またはhEGF-Ⅱ各々との併用効果について上記と同様の実験を行ったところ、上記と同様の結果が得られた。

実験例12

hEGFのアミノ酸配列のうちC末端側のアミノ酸残基が2個欠けたフラグメントであるhEGF-Ⅱを用いて、前記実験例1と同様に制ガン作用増強効果を調べた。

hEGF-ⅡはhEGFのフラグメントではあるが、受容体の結合能や生物活性はhEGFと同等であることは前記したとおりである。

実験方法および結果

実験は、実験例1と同様に行った。ただし、被検液投与群は、5-FU150mg/kgを単独皮下投与した群、5-FU150mg/kgとhEGF-Ⅱ100μg/kgとを併用皮下投与した群、および化合物投与群とした。

第 5 表	投与群 日数	化合物無投与群		5-FU単独投与群		hEGF-Ⅱ+5-FU併用投与群	
		100	100	100	100	100	100
	1	100	100	100	100	100	100
	2	169.9 ± 10.2	121.1 ± 9.6	121.1 ± 9.6	100.0 ± 5.9 ^(*)	100.0 ± 5.9 ^(*)	100.0 ± 5.9 ^(*)
	3	215.6 ± 7.6	120.4 ± 7.1	120.4 ± 7.1	99.8 ± 7.2 ^(*)	99.8 ± 7.2 ^(*)	99.8 ± 7.2 ^(*)
	4	307.2 ± 31.9	124.0 ± 9.6	124.0 ± 9.6	81.3 ± 5.5 [#]	81.3 ± 5.5 [#]	81.3 ± 5.5 [#]
	5	330.2 ± 35.2	122.5 ± 10.7	122.5 ± 10.7	97.5 ± 8.4 ^(*)	97.5 ± 8.4 ^(*)	97.5 ± 8.4 ^(*)
	6	367.3 ± 45.3	129.7 ± 11.5	129.7 ± 11.5	93.3 ± 5.8 [*]	93.3 ± 5.8 [*]	93.3 ± 5.8 [*]
	7	508.9 ± 61.3	156.8 ± 14.1	156.8 ± 14.1	93.7 ± 5.9 [#]	93.7 ± 5.9 [#]	93.7 ± 5.9 [#]

実験例 13

hEGFのアミノ酸配列のN末端より21番目のメチオニンがロイシン(Leu)に置換されたhEGF誘導体である(Leu²¹) - hEGFを用いて、前記実験例1と同様に制ガン作用増強効果を調べた。

実験方法および結果

実験は、実験例1と同様に行った。

ただし、被検投与群は、5-FU 150 mg/kgを単独皮下投与した群、5-FU 150 mg/kgと(Leu²¹) - hEGF 100 μg/kgとを併用皮下投与した群、および化合物無投与群とした。

得られた結果は、第8図に示す通りであった。図中の記号は下記の通りである。

- : 化合物無投与群。
- : 5-FU投与群。
- : (Leu²¹) - hEGF + 5-FU併用投与群。

なお、被検液は以下の通りであった。

(Leu²¹) - hEGF : 100 μg / 10 ml /

(5-FU)に変化するテガフル(フトラフル)を用いて実験例4と同様に制ガン作用増強効果を調べた。

実験は、被検液投与群を、テガフル 400 mg/kgを単独皮下投与した群、テガフル 400 mg/kgとhEGF 100 μg/kgとを併用皮下投与した群および化合物無処置群としたこと以外は実験例4と同様に行った。

なお、化合物の投与は1日目と4日目の合計2回行った。被検液は以下の通りであった。

hEGF : 実験例1に同じ。

テガフル : フトラフル[®]注(大鵬薬品工業株)

を400 mg / 10 ml / kgの用量で使用した。

得られた結果は、第6表に示す通りであった。同表中、日数とは初回の化合物投与日を1日目とした実験日数を示し、1日目の化合物投与直前のガン重量を100としている。

各数値は7匹の平均値±標準誤差を示す。表中*、**の印は、テガフル単独投与群に対して併

kgとなるように(Leu²¹) - hEGFを溶媒(0.01% Tween 80を含むpH 7.4の生理食塩水)に溶解したもの。

5-FU : 実験例1に同じ。

この結果より、(Leu²¹) - hEGF 100 μg/kgと5-FU 150 mg/kgとを併用することによって投与翌日から著明なガン増殖抑制効果が認められ、投与9日後まで、投与日とはほぼ同程度のガンの大きさに抑えられた。5-FU単独投与群に比べると、この大きさは、9日後でも約1/4程度であった。図中(*、*、**の印を付けたように、5-FU単独投与群に比べて統計学的にも有意な持続的制ガン効果の増強作用が認められた。

また、5-FUの代わりにアルキル化剤であるシクロホスファミドを用い、これとhEGFまたはhEGF - IIとを組合せ各々について上記と同様の実験を行ったところ、同様の結果が得られた。

実験例 14

生体内で代謝を受けて5-フルオロウラシル

用投与群のガン重量が統計学的に有意に抑制されたことを示す(Pの定義は前記の通り)。

この結果より、hEGF + テガフル併用投与群は、投与後翌日からテガフル単独投与群に対して有意な持続的なガン細胞増殖抑制が認められた。

また、hEGFの代わりに(Leu²¹) - hEGFまたはhEGF - IIを用いて各々について上記と同様の実験を行ったところ、同様の結果が得られた。

第 6 表

投与群 日数	化合物無処置群	テガフール単独投与群	テガフール hEGF	併用投与群
1	100	100	100	
2	182.8±42.1	89.0±10.5	50.9±11.1*	
3	208.8±37.5	102.1±13.5	32.8±10.2*	
4	240.4±25.5	105.5±18.4	34.1±12.4*	
5	301.6±21.3	104.2±22.6	27.7±5.0*	
6	380.7±24.2	94.5±16.9	30.6±8.3*	
7	448.3±50.2	131.4±23.3	11.4±5.4*	
8	560.2±48.1	143.7±20.6	17.0±4.2*	

林の印は、シクロホスファミド単独投与群に対して併用投与群のガン重量が統計学的に有意に抑制されたことを示す（Pの定義は前記の通り）。

この結果により、hEGF+シクロホスファミド併用投与群では、投与後翌日からシクロホスファミド単独投与群に対して有意な、かつ持続的なガン細胞増殖抑制効果が認められた。

第 7 表

投与群 日数	化合物無処置群	シクロホスファミド 単独投与群	hEGF シクロホスファミド	併用投与群
1	100	100	100	
2	194.9±58.1	145.2±18.2	99.4±10.0*	
3	239.8±57.6	147.6±13.7	95.4±13.5*	
4	282.5±15.5	102.4±8.6	69.4±5.2*	
5	313.6±21.3	92.2±5.1	69.6±6.7*	
6	415.6±24.2	108.5±19.6	54.5±13.2*	
7	524.5±50.6	110.9±21.3	43.8±13.6*	

実験例 15

制ガン剤のうちでアルキル化剤の分野に分類されるシクロホスファミドを用いて、実験例4と同様に制ガン作用増強効果を調べた。実験は、被液投与群を、シクロホスファミド200mg/kgを単独皮下投与した群、シクロホスファミド200mg/kgとhEGF100μg/kgとを併用、皮下投与した群、および化合物無処置群とした以外は実験例4と同様に行った。

被検液は、以下の通りであった。

hEGF：実験例1に同じ。

シクロホスファミド：200mg/10ml/kgとなるようにシクロホスファミドを生理食塩水に溶解したもの。

得られた結果は、第7表に示す通りであった。

化合物は、初回を1日目に、2回目を3日目に投与した。同表中、日数とは初回の化合物投与日を1日目とした実験日数を示し、1日目の化合物投与直前のガン重量を100としている。各数値は、8匹の平均値±標準誤差を示す。表中、*、

また、hEGFの代わりに〔Leu²¹〕-hEGFを用いて上記と同様の実験を行ったところ、同様の結果が得られた。

実験例 16

抗生物質系の制ガン剤であるマイトマイシンC (MMC) を用いて、実験例4と同様に制ガン増強効果を調べた。

実験は、被検投与群を、MMC 5mg/kgを単独皮下投与した群、MMC 5mg/kgとhEGF 100μg/kgとを併用皮下投与した群、MMC 5mg/kgとhEGF・II 100μg/kgとを併用皮下投与した群、MMC 5mg/kgと〔Leu²¹〕-hEGF 100μg/kgとを併用皮下投与した群、および化合物無処置群とした以外は実験例4と同様に行った。

被検液は、以下の通りであった。

hEGF：実験例1に同じ。

hEGF・II：実験例8に同じ。

〔Leu²¹〕-hEGF：実験例7に同じ。

MMC：5mg/10ml/kgとなるようにMMCを

蒸留水に溶解し体液と等張としたもの。

得られた結果は、第8表に示す通りであった。

尚、化合物は、初回を1日目に、2回目を5日目に投与した。同表中、日数とは初回の化合物投与日を1日目とした実験日数を示し、1日目の化合物投与直前のガン重量を100としている。各数値は6匹の平均値±標準誤差を示す。表中、*、**の印はMMC単独投与群に対して各々の併用投与群のガン重量が統計学的に有意に抑制されたことを示す（Pの定義は前記の通り）。

この結果より、hEGF+MMC、hEGF・II+MMC、〔Leu²¹〕-hEGF+MMC併用投与群には投与後翌日からMMC単独投与群に対して、有意な、かつ持続的なガン細胞増殖抑制効果が認められた。

第 8 表

投与群 日数	化合物無処置群	MMC単独投与群	hEGF MMC	併用投与群	hEGF・II MMC	併用投与群	〔Leu ²¹ 〕 -hEGF 併用投与群 MMC
1	100	100	100		100		100
2	194.9±58.1	130.8±8.5	97.2±5.1**		90.5±10.1*		100.1±5.1*
3	239.8±57.6	106.1±9.4	96.6±5.7		98.3±5.6		81.3±28.1
4	282.5±15.5	95.8±5.5	72.2±5.7*		80.3±9.2		85.6±29.1
5	313.6±21.3	98.6±3.9	68.6±10.5*		54.4±6.3**		86.3±14.3
6	415.6±24.2	160.7±10.9	90.0±10.3**		64.3±10.8**		75.4±8.9**
7	524.5±50.6	150.8±15.9	100.1±6.7*		98.8±6.7*		88.1±9.6**
8	590.6±61.5	263.6±30.8	130.3±30.3*		144.4±28.1*		160.3±15.8*
9	603.3±28.9	308.7±54.0	138.9±21.8*		156.3±14.3*		182.4±30.8(*)

実験例 17

白金製剤のシスプラチンを用いてマウス卵巣ガンM5076の固型ガンに対するhEGF、(Leu²¹) - hEGF、hEGF - II各々のシスプラチンとの併用による制ガン作用増強効果を、ガン重量の増減を測定することにより検定した。

(1) 実験動物

BDF₁ 雄性マウスを用いた。飼育条件は実験例1に同じ。

(2) 実験方法及び実験結果

マウス卵巣ガンM5076をマウス臍下部皮下に1匹あたり1~2×10⁶ Cells 移植した。移植後12日後に、ガンの大きさを実験例1

(Colon 26)と同様の方法で測定して、ガン重量を算出した。

実験開始時のマウスの群分け操作は、実験例1と同様に行った。化合物の投与は、実験例9と同様に行った。

得られた結果は、第9表に示す通りであった。表中の記号は、前記のとおりである。

この結果より、マウスの卵巣ガンに対してもhEGF、(Leu²¹) - hEGF、hEGF - II各々とシスプラチンの併用がシスプラチン単独の制ガン効果をさらに増強したことが明らかであるといえよう。なお、この効果は統計学的にも有意な、かつ持続的効果であった。

第 9 表

投与群 日数	化合物無処置群	シスプラチン単独投与群	シスプラチン (Leu ²¹) - hEGF 併用投与群	シスプラチン (Leu ²¹) - hEGF 併用投与群	シスプラチン hEGF - II 併用投与群
1	100	100	100	100	100
2	144.9±15.9	126.4±9.0	99.1±6.7*	100.1±8.7(*)	95.3±4.8**
3	153.9±14.9	125.49±8.3	105.2±13.2	95.6±8.6*	98.4±6.5*
4	194.6±18.2	136.9±5.2	103.6±11.7*	101.1±5.6**	100.1±4.5**
5	207.4±20.9	143.6±14.5	113.6±9.4(*)	120.3±10.1	115.6±6.3(*)
6	225.2±19.1	192.0±20.6	135.4±14.7*	140.6±24.5	144.4±10.8*

また、シスプラチンの代わりに抗生物質である
 マイトマイシンCを用い、これとhEGF、
 (Leu²¹) - hEGFまたはhEGF - IIを各
 々用いて上記と同様の実験を行ったところ、上記
 と同様の結果が得られた。

実験例18

実験例4と同様に、hEGF、(Leu²¹) -
 hEGF、hEGF - II各々と5-FUを用いて
 マウス卵巣ガンM5076の固型ガンに対する制
 ガン作用増強効果を実験例17と同様に検定した。

実験は、被検液については実験例1、7と、他
 については実験例15と同様に行った。

結果は、第10表に示す通りであった。表中の
 記号は前記の通りである。

第10表

投与群 日数	化合物無処置群	5-FU単独投与群	5-FU hEGF 併用投与群	5-FU (Leu ²¹) 併用投与群 - hEGF	5-FU hEGF - II 併用投与群
1	100	100	100	100	100
2	144.9±15.9	114.7±7.5	100.9±7.9	98.6±9.8	101.3±8.6
3	153.9±14.9	115.2±8.3	93.8±4.8*	100.1±5.6	89.5±11.3(*)
4	194.6±18.2	134.6±8.9	93.9±9.2**	95.9±8.3**	90.3±10.1**
5	207.4±20.9	187.3±19.3	123.9±14.1*	116.5±20.3*	134.4±9.8*
6	225.2±19.1	230.1±29.4	140.1±11.8*	166.4±21.4(*)	155.5±15.0*

この結果より、マウスの卵巣ガンに対しても hEGF、(Leu²¹) - hEGF、hEGF - II 各々と 5-FU の併用が 5-FU 単独の制ガン作用をさらに増強したことが明らかである。

この効果は統計学的にも有意で、かつ持続的効果であった。

また、代謝拮抗剤である 5-FU の代わりにテガフルを用い、これと hEGF、(Leu²¹) - hEGF または hEGF - II 各々を用いて上記と同様の実験を行ったところ、上記と同様の結果が得られた。さらに、アルキル化剤であるシクロホスファミドを用いても同様の結果が得られた。

実験例 19

成長因子等のうちで血小板由来成長因子族に分類される繊維芽細胞成長因子 (FGF) を用いて、前記実験例 4 と同様に制ガン作用増強効果を調べた。

実験方法および結果

実験は、実験例 4 と同様に行った。ただし、hEGF を FGF に変更して行った。

被検液は以下の通り。

FGF: 100 μ g / 10ml / kg となるように

FGF (東洋紡) を 0.001% の Tween 80 を含んだ生理食塩水に溶解したもの。

5-FU: 実験例 1 と同じ。

得られた結果は、第 11 表に示す通りであった。

尚、同表中の記載は前記実験例に同じ。各数値は 6~8 匹の平均値 \pm 標準誤差を示す。統計学的有意差等は、前記実験例に同様。

この結果より、FGF + 5-FU 併用投与群は投与後翌日から 5-FU 単独投与群に対して統計学的に有意な、かつ持続的ガン増殖抑制効果が認められた。

第 11 表	投与群 日数	化合物無投与群	5-FU 単独投与群	EGF - II 併用投与群	
				5-FU	5-FU
	1	100	100	100	100
	2	126.3 \pm 12.6	102.6 \pm 6.7	82.8 \pm 7.1	7.1 (*)
	3	132.3 \pm 9.8	99.7 \pm 7.2	76.2 \pm 3.6	3.6 *
	4	166.7 \pm 22.6	94.9 \pm 8.7	68.8 \pm 7.6	7.6 *
	5	234.5 \pm 12.4	158.6 \pm 22.8	71.5 \pm 5.8	5.8 *

また、5-FU の代わりに抗生物質であるマイトマイシン C や、アルキル化剤であるシクロホスファミドさらには白金製剤であるシスプラチンを用いて上記と同様の実験を行ったところ、上記と同様の結果が得られた。

実験例 20

インスリン様成長因子類のうちで hIGF - II を用いて、前記実験例 4 と同様の実験系で、ヒト IGF - II (hIGF - II) と以下の制ガン作用を有する化合物との併用による制ガン効果を、ガン重量の増減を測定することにより検定した。

対象とした制ガン作用を有する化合物は、以下のものである。

テガフル: 400 μ g / kg、皮下投与

5-FU: 150 μ g / kg、皮下投与

マイトマイシン - C: 5 μ g / kg、皮下投与

シスプラチン: 5 μ g / kg、皮下投与

実験は、投与群を、上記化合物を表示した用法用量にて単独投与した群、および制ガン作用を有する化合物各々と hIGF - II 50 μ g / kg とを

併用皮下投与した群、および化合物無処置群としたこと以外は実験例4と同様に行った。

尚、被検液は、以下の通り。

h I G F - II : 50 μ g / 10 ml / kg となるよう

h I G F - II を溶媒 (0.001%

Tween 80 を含む pH 7.7 の 1/15

M リン酸ナトリウム緩衝液) に溶解

したもの。

テガフル : 実験例14と同じ。

5-FU : 実験例1と同じ。

マイトマイシン-C : 実験例16と同じ。

シスプラチン : 実験例8と同じ。

得られた結果は、第12表に示す通りであった。

同表中の数値は、化合物投与の直前のガン重量を100とし、例数8~10匹の平均値±標準誤差を示す。表中(*)、*、**の印は各制ガン作用を有す化合物各々を単独投与した群に対する I G F - II 併用投与群の統計学的有意差を示す (P の定義は前記の通り)。尚、この結果は化合物投与4日後の値である。

第 12 表

投 与 群	ガン重量比 (%)
化合物無処置群	205.1 ± 12.3
テガフル単独投与群	95.2 ± 15.4
I G F - II + テガフル併用投与群	49.8 ± 9.5*
5-FU単独投与群	84.5 ± 7.0
I G F - II + 5-FU併用投与群	50.6 ± 4.8**
マイトマイシン-C単独投与群	95.8 ± 5.5
I G F - II + マイトマイシン-C併用投与群	73.4 ± 5.8*
シスプラチン単独投与群	145.6 ± 9.1
I G F - II + シスプラチン併用投与群	98.4 ± 8.2**

この結果より、I G F - II と上記制ガン作用を有する化合物との併用投与群では、全ての各制ガン作用を有する化合物の単独投与群に比べて著大なガン細胞増殖抑制が認められた。

実験例 21

インスリンを用いて、前記実験例4と同様の実験系で、インスリンと以下の制ガン作用を有する化合物の併用による制ガン効果を、実験例20と同様の方法で検定した。

制ガン作用を有する化合物と被検液は、以下のものである。

テガフル : 400 μ g / kg、皮下投与、
実験例14と同じ。

マイトマイシン-C : 5 μ g / kg、皮下投与、
実験例16と同じ。

アドリアマイシン : 10 μ g / kg、皮下投与、
実験例10と同じ。

シスプラチン : 5 μ g / kg、皮下投与、
実験例8と同じ。

インスリン : 50 μ g / kg、皮下投与、
実験例3と同じ。

得られた結果は、第13表に示す通りであった。同表中の数値や記号については実験例23と同様とした。

この結果より、インスリンと上記制ガン作用を有す化合物併用投与群では、全ての上記各制ガン作用を有す化合物単独投与群に比べ、著名な制ガン効果を得た。

第 1 3 表

投 与 群	ガン重量比 (%)
化合物無処置群	205.1 ± 12.3
テガフル単独投与群	95.2 ± 15.4
インスリン+テガフル併用投与群	56.3 ± 3.2*
マイトマイシン - C 単独投与群	95.8 ± 5.5
インスリン+マイトマイシン - C 併用投与群	70.6 ± 4.3**
アドリアマイシン単独投与群	102.4 ± 10.4
インスリン+アドリアマイシン併用投与群	70.2 ± 6.5*
シスプラチン単独投与群	145.6 ± 9.1
インスリン+シスプラチン併用投与群	90.6 ± 5.8**

実験例 2 2

トランスフォーミング成長因子類のうちでヒトトランスフォーミング成長因子 α (hTGF α)を用いて、前記実験例 4 と同様の実験系で、hTGF α と下記制ガン作用を有する化合物との併用による制ガン効果を、ガン重量の増減を測定することにより検定した。

実験は、投与群を下記制ガン作用を有する化合物を各々単独投与した群、インスリンと下記制ガン作用を有する化合物各々を併用投与した群、および化合物無処置群としたこと以外は実験例 2 0 と同様に行った。

尚、被検液は、以下の通り。

hTGF α : 100 μ g / 10 ml / kg となるように TGF α を 0.001 % の Ivccen 80 を含んだ pH 5.9 の 1/15M リン酸ナトリウム緩衝液に溶解したもの。

制ガン作用を有する化合物 :

5 : FU : 実験例 1 と同じ。

テガフル : 実験例 1 4 と同じ。

マイトマイシン - C : 実験例 1 6 と同じ

アドリアマイシン : 実験例 1 0 と同じ。

シスプラチン : 実験例 3 と同じ。

得られた結果は、第 1 4 表に示す通りであった。

同表中の記号は、第 1 2 表の説明に同じである。

この結果より、TGF α + 各制ガン作用を有する化合物の併用投与群では著名な制ガン効果があった。

第 1 4 表

投 与 群	ガン重量比 (%)
化合物無処置群	205.1 ± 12.3
5-FU単独投与群	84.5 ± 7.0
hTGF α + 5-FU併用投与群	42.3 ± 5.3 [※]
テガフル単独投与群	95.2 ± 15.4
hTGF α + テガフル併用投与群	38.6 ± 8.9 [※]
マイトマイシン・C単独投与群	95.8 ± 5.5
hTGF α + マイトマイシン・C併用投与群	69.8 ± 7.8 [※]
アドリアマイシン単独投与群	102.4 ± 10.4
hTGF α + アドリアマイシン併用投与群	63.8 ± 8.9 [※]
シスプラチン単独投与群	145.6 ± 9.1
hTGF α + シスプラチン併用投与群	79.8 ± 10.3 [※]

テガフル：実験例14と同じ。

マイトマイシン・C：実験例16と同じ。

アドリアマイシン：実験例10と同じ。

シスプラチン：実験例3と同じ。

シクロホスファミド：実験例15と同じ。

得られた結果は、第15表に示す通りであった。

同表中の記号は、第12表の説明に同じである。

尚、この結果は、化合物投与後4日目の結果である。

この結果より、hTGF β + hEGF + 各制ガン作用を有す化合物の併用投与群で著大な制ガン効果が得られた。

実験例23

hTGF β とhEGFを用いて、前記実験例4と同様の実験系で、hTGF β + hEGFと下記制ガン作用を有する化合物との併用による制ガン効果をガン重量の増減を測定することにより検定した。

実験は、被検液投与群を、下記制ガン作用を有する化合物を単独皮下投与した群、下記制ガン作用を有する化合物とhTGF β 50 mg/kg及びhEGF 100 μ g/kgとを併用投与した群、および化合物無処置群としたこと以外は実験例4と同様に行った。

尚、被検液は、以下の通り。

hTGF β ：50 mg/10 ml/kgとなるように

hTGF β (BTI社)を0.001

%のTveen 80を含んだ生理食塩水に溶解したもの。

hEGF：実験例1と同じ。

制ガン作用を有する化合物は、下記のものである。

5-FU：実験例1と同じ。

第 1 5 表

投 与 群	ガン重量比 (%)
化合物無処置群	216.3 ± 20.4
5-FU単独投与群	103.3 ± 15.4
hEGF + hTGF β + 5-FU併用投与群	43.1 ± 7.8 [※]
テガフル単独投与群	118.0 ± 9.8
hEGF + hTGF β + テガフル併用投与群	32.0 ± 4.0 [※]
マイトマイシン・C単独投与群	101.1 ± 8.3
hEGF + hTGF β + マイトマイシン・C併用投与群	70.0 ± 8.4 [※]
アドリアマイシン単独投与群	120.3 ± 11.3
hEGF + hTGF β + アドリアマイシン併用投与群	65.5 ± 5.9 [※]
シスプラチン単独投与群	139.8 ± 9.9
hEGF + hTGF β + シスプラチン併用投与群	80.0 ± 4.1 [※]
シクロホスファミド単独投与群	90.6 ± 7.6
hEGF + hTGF β + シクロホスファミド併用投与群	42.7 ± 6.5 [※]

実験例 24

FGFを用いて前記実験例4と同様の実験系でFGFとテガフルの併用による制ガン作用をガン重量の増減を測定することにより検定した。

実験は、実験例19とほぼ同じとした。ただし、5-FUをテガフルに変更して行った。

結果は、第16表に示す通りであった。

この結果より、FGF+テガフル併用投与群のガン重量から投与後4日目の時点で統計学的に有意な制ガン効果が認められた。

第16表

投 与 群	ガン重量比 (%)
化合物無処置群	189.6 ± 9.8
テガフル単独投与群	103.1 ± 13.1
FGF+テガフル併用投与群	68.3 ± 7.8*

実験例 25

hEGF、hEGF-Ⅱ、[Leu²¹]・hEGFまたはレチノイック・アシッド (Retinoic acid) (RA)を用いて、前記実験

[Leu²¹]・hEGFおよび(または)RAとテガフルとの併用投与群で顕著な制ガン効果が認められた。

例4と同様の実験系で、これらとテガフルとの併用による制ガン効果を、ガン重量の増減を測定することにより検定した。

実験は、被検液投与群をテガフル400ag/kg単独皮下投与した群、テガフル400ag/kgとhEGF、hEGF-Ⅱ、または[Leu²¹]・hEGF各々100μg/kgとRA 30ag/kgとを併用皮下投与した群、および化合物無処置群としたこと以外は実験例4と同様に行った。

尚、被検液は、以下の通り。

hEGF：実験例1と同じ。

hEGF-Ⅱ：実験例7と同じ。

[Leu²¹]・hEGF：実験例13と同じ。

RA：30ag/10ml/kgとなるようにRAをオリーブ油に溶解したもの。

テガフル：実験例14と同じ。

得られた結果は、第17表に示す通りであった。同表中の記号は、第1表の説明に同じである。尚、この結果は、化合物投与後4日目の結果である。

この結果より、hEGF、hEGF-Ⅱ、

第17表

投 与 群	ガン重量比 (%)
化合物無処置群	183.8 ± 24.1
テガフル単独投与群	90.6 ± 11.5
hEGF+テガフル併用投与群	44.0 ± 12.3*
hEGF-Ⅱ+テガフル併用投与群	38.6 ± 8.9**
[Leu ²¹]・hEGF+テガフル併用投与群	40.1 ± 7.4**
hEGF+RA+テガフル併用投与群	20.3 ± 5.8**
hEGF-Ⅱ+RA+テガフル併用投与群	28.6 ± 6.4**
[Leu ²¹]・hEGF+RA+テガフル併用投与群	24.1 ± 10.1**

実験例26

テガフルとウラシルの配合剤であるユーエフティ (UFT) を用いて、実験例4と同様に成長因子等と併用した際の制ガン効果を調べた。

実験は、被検液投与群を、UFT 650 mg/kg 単独経口投与した群、UFT 650 mg/kg (経口投与) と下記成長因子等 (皮下投与) とを併用した群、および化合物無処置群としたこと以外は実験例4と同様に行った。

尚、被検液は、以下の通り。

hEGF : 実験例1と同じ。

hEGF-Ⅱ : 実験例7と同じ。

(Leu²¹) - hEGF : 実験例13と同じ。

hTGF_α : 実験例22と同じ。

hTGF_β : 実験例23と同じ。

FGF : 実験例19と同じ。

インスリン : 実験例3と同じ。

hIGF-Ⅱ : 実験例20と同じ。

UFT : UFTカプセル (大鵬薬品工業㈱) の内容物を5%アラビアゴム水溶液に懸濁させ、

UFTとして650 mg/kgとなるように経口投与した。

得られた結果は、第18表に示す通りであった。同表中の記号は、第12表の説明に同じである。

この結果より、成長因子等とUFTとを併用投与することによって著名なガン増殖抑制効果が認められた。なお、第18表中の値は、化合物投与後20日のガン重量比を示し、化合物投与直前を100としたものである。

第18表

投与群	ガン重量比 (%)
化合物無処置群	110.3 ± 8.7
UFT単独投与群	80.5 ± 7.5
hEGF+UFT併用投与群	51.7 ± 7.9 [*]
hEGF-Ⅱ+UFT併用投与群	55.3 ± 6.8 [*]
(Leu ²¹) + UFT併用投与群	54.6 ± 8.1 [*]
hTGF _α + UFT併用投与群	40.3 ± 5.1 [†]
hEGF+hTGF _β + UFT併用投与群	41.2 ± 6.5 [†]
FGF+UFT併用投与群	59.9 ± 5.1 [*]
インスリン+UFT併用投与群	58.6 ± 8.3 ^(*)
hIGF-Ⅱ+UFT併用投与群	53.8 ± 6.5 [*]

実験例27

アントラサイクリン系制ガン抗生物質であるアドリアマイシンに対して耐性をもったマウス白血病の固型ガンに対するhEGF、hEGF-Ⅱおよび (Leu²¹) - hEGF各々とアドリアマイシン併用の制ガン効果を、ガン重量の増減を測定することにより検定した。

実験は、実験例5とほぼ同様に行った。ただし、ガン細胞をP388/Adr.に、制ガン作用を有する化合物をアドリアマイシンに変更した。

尚、被検液は、以下の通りであった。

hEGF : 実験例1と同じ。

hEGF-Ⅱ : 実験例7と同じ。

(Leu²¹) - hEGF : 実験例13と同じ。

アドリアマイシン : 実験例2と同じ。

得られた結果は、第19表に示す通りであった。同表中の記号は、第2表の説明に同じである。

この結果から、5-FU耐性ガンばかりでなくアドリアマイシン耐性ガンに対しても制ガン効果が認められた。したがって、成長因子等は、薬剤

耐性ができたガンに対して非常に有効な効果を示すであろうと思われる。尚、第19表中の値は化合物投与2日目の値を示し、投与直前を100としたものである。

第 19 表

投 与 群	ガン重量比 (%)
化合物無処置群	181.3 ± 8.9
アドリアマイシン単独投与群	179.1 ± 5.8
hEGF + アドリアマイシン併用投与群	118.3 ± 6.5 ^{##}
hEGF - II + アドリアマイシン併用投与群	120.5 ± 5.9 ^{##}
(Leu ²¹) - hEGF + アドリアマイシン併用投与群	119.4 ± 8.5 ^{##}

実験例 28

hEGFの作用持続時間及び投与スケジュールを設定する目的で実験例4と同様に5-FUを用いてhEGFの制ガン作用増強効果の持続性を調べた。実験は、5-FUを単独皮下投与した群、及び5-FUとhEGFを併用皮下投与した群とした。このうち5-FUとhEGFとを併用皮下投与した群では次の6つの群を設定した。すなわち、5-FUを投与する3日前にhEGFを投与した群、5-FUを投与する2日前にhEGFを投与した群、5-FUを投与する1日前にhEGFを投与した群、5-FUとhEGFとを同時投与した群、5-FUを投与した1日後にhEGFを投与した群、5-FUを投与した2日後にhEGFを投与した群である。それ以外は実験例4と同様に行った。

結果は、第20表に示すとおりであった。尚、この結果は、5-FUを投与した4日後に計測したものである。

処 置	ガン重量 % (平均値 ± 標準偏差)
5-FU単独投与群	93.9 ± 6.7
5-FU投与の3日前にhEGFを投与	81.0 ± 8.8
2 "	76.9 ± 8.4
1 "	49.7 ± 9.4 ^{##}
5-FUとhEGFを同時投与	58.8 ± 6.7 ^{##}
5-FU投与の1日後にhEGFを投与	99.9 ± 8.5
2 "	112.6 ± 18.5

第 20 表

この結果から、5-FUとhEGFを同時に併用投与したときのみならず、5-FUを投与する1日前にhEGFを前投与しておいても著明なガン増殖の抑制効果が認められた。

これはin vitroの実験からは全く予想し得なかった事象であり、hEGFの作用時間の長さを示すものである。

これらの結果から生体内で徐放性にhEGFを放出させつつ5-FU等制ガン作用を有する化合物を投入する方法も考えられ、利用可能範囲は大いに拡大できよう。

実験例29

本発明における制ガン作用を有する化合物(イ)及び成長因子等(ロ)の用法について次の実験を行った。

すなわち、(イ)と(ロ)を併用投与する場合に、両者を混合して溶液としてこれを投与する方法を試みた。実験方法は、実験例4と同様とした。尚、被検投与液は(イ)と(ロ)を併用する際のみ混注としたこと以外はすべて実験例4と同様に

行った。

(イ) テガフル：実験例14に同じ。

アドリアマイシン：実験例10に同じ。

シスプラチン：実験例8に同じ。

(ロ) hEGF：実験例1に同じ。

(Leu²¹) - hEGF：実験例13に同じ。

hEGF - II：実験例7に同じ。

TGF_α：実験例22に同じ。

インスリン：実験例3に同じ。

FGF：実験例19に同じ。

表211

	テガフル		アドリアマイシン		シスプラチン	
	混注	別注	混注	別注	混注	別注
(イ)						
hEGF	42.0	45.0	103.1	98.5	88.8	80.3
(Leu ²¹) hEGF	48.1	50.3	99.6	97.8	90.4	100.1
hEGF - II	47.8	42.8	105.6	103.3	102.3	96.6
TGF _α	34.3	40.6	98.4	92.6	80.4	80.1
インスリン	58.9	48.1	110.2	121.1	105.6	110.3
FGF	50.3	55.4	89.8	99.1	78.4	86.5
(ロ)						

この結果から、混注でも別注と同等の効果を得ることができたことが分る。

この事実、製剤上有益であろう。

実施例1) 注射剤

ヒトEGFを発熱物質不含の0.1w/v%ゼラチンを含む1/15Mリン酸緩衝液に溶かして最終濃度を20μg/mlにした。例えば、pH7.4の場合は、終濃度75mMの塩化ナトリウムを加えた。この溶液を無菌の膜ろ過、例えば0.22μmのマイレックス-CV (Milllexは登録商標) フィルター(ミリポア社製)を介して5mlずつ各アンプルに分注して密封した。

実施例2) 注射剤

ヒトEGFを発熱物質不含の0.001w/v%ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル(ポリソルベート80)を含む1/15Mリン酸緩衝液に溶かして、最終濃度を20μg/mlにした。例えば、pH7.4の場合は、終濃度75mMの塩化ナトリウムを加えた。この溶液を実施例1と同一の要領で除菌ろ過して、アンプルに5mlずつ

分注、密封した。

実施例3) 凍結乾燥注射剤

先の実施例1で調製された注射剤にマンニトールを最終濃度2w/v%となるように溶解する。この液を実施例1と同じ要領で除菌ろ過した後に、5mlずつ、ガラス製バイアル瓶に分注し、-40℃で、1時間で凍結させ、-10℃、真空度0.04mmHgで凍結乾燥機を用いて凍結乾燥し、常法により無菌状態で密封した。

実施例5) 注射剤

牛脳EGFを発熱物質不含の0.1W/V%ゼラチンを含む1/15Mリン酸塩緩衝液に溶かして最終濃度を20ag/mlにした。例えば、pH7.4の場合は、終濃度75mMの塩化ナトリウムを加えた。この溶液を実施例1と同一の要領で除菌ろ過し、アンプル5mlずつ分注の後、密封した。

実施例6) 注射剤

牛脳EGFを発熱物質不含の0.001W/V%ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル

ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル(ポリソルベート80)	10μg
注射用蒸留水	適量
水酸化ナトリウム	適量
(pH7.4に合せる)	
1バイアル当り	1ml

実施例10) 注射剤

ヒトEGF	100μg
酢酸ナトリウム	6ag
パラオキシ安息香酸メチルエステル	
テル	5ag
無水グリセロール	80ag
ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル(ポリソルベート80)	50μg
注射用蒸留水	適量
水酸化ナトリウム	適量
(pH7.4に合せる)	
1バイアル当り	5ml

(ポリソルベート80)を含む1/15Mリン酸塩緩衝液に溶かして、最終濃度を20ag/mlにした。例えば、pH7.4の場合は、終濃度75mMの塩化ナトリウムを加えた。この溶液を実施例1と同一の要領で除菌ろ過し、アンプル5mlずつ分注の後、密封した。

実施例7) 凍結乾燥注射剤

先の実施例5で調製された注射剤より実施例3と同一の要領で凍結乾燥注射剤を調製した。

実施例8) 凍結乾燥注射剤

先の実施例6で調製された注射剤より実施例3と同一の要領で凍結乾燥注射剤を調製した。

実施例9) 注射剤

0.5W/V%亜鉛含有ヒトインシュリン	40I.U.
(塩酸に溶解後、他の成分と混合)	
酢酸ナトリウム・3H ₂ O	1.4ag
パラオキシ安息香酸メチルエステル	
テル	1ag
無水グリセロール	16ag

上記配合割合で実施例1と同一の要領で除菌ろ過し、注射剤を調製した。

実施例11) 注射剤

ヒトEGF	100μg
フェノール	10ag
無水グリセロール	80ag
ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル(ポリソルベート80)	50μg
注射用蒸留水	適量
水酸化ナトリウム	適量
(pH7.4に合せる)	
1バイアル当り	5ml

上記配合割合で実施例B1と同一の要領で除菌ろ過し、注射剤を調製した。

実施例12) 注射剤

ヒトEGF	100μg
m-クレゾール	15ag
無水グリセロール	80ag

ポリオキシエチレンソルビタン	
脂肪酸エステル（ポリソルベート80）	50 μ g
注射用蒸留水	適量
水酸化ナトリウム	適量
(pH 7.4に合せる)	

1バイアル当り 5ml

上記配合割合で実施例1と同一の要領で除菌ろ過し、注射剤を調製した。

実施例13) 凍結乾燥注射剤

ヒトEGFとヒトEGF IIとをそれぞれ最終濃度10 μ g/mlとなるように、発熱物質不含の0.1v/v %ゼラチンを含む1/15Mリン酸ナトリウム緩衝液に溶かした。pHは7.4とし、終濃度75mMの塩化ナトリウムを加えた。この溶液を実施例1と同一の要領で除菌ろ過し、この溶液から実施例3と同一の要領で凍結乾燥注射剤を調製した。

実施例14) 凍結乾燥注射剤

ヒトEGFとヒトEGF IIとを、それぞれ最終

1/15Mリン酸ナトリウム緩衝液に溶かして最終濃度を20 μ g/mlにした。pHは7.4とし、終濃度75mMの塩化ナトリウムを加えた。この溶液を実施例1と同一のよう流で除菌ろ過し、この溶液から実施例3と同一の要領で凍結乾燥注射剤を調製した。

実施例17) 注射剤

ヒトTGF α を発熱物質不含の0.1v/v %ゼラチンを含む1/15Mリン酸ナトリウム緩衝液に溶かして最終濃度を20 μ g/mlにした。pHは5.9とし、終濃度89mMの塩化ナトリウムを加えた。この溶液を実施例1と同一の要領で除菌ろ過し、アンプル5mlずつ分注の後、密閉した。

実施例18) 注射剤

ヒトTGF α を発熱物質不含の0.001v/v %ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル（ポリソルベート80）を含む1/15Mリン酸ナトリウム緩衝液に溶かして、最終濃度を20 μ g/mlにした。pHは5.9とし、終濃度89mMの塩化ナトリウムを加えた。この溶液を実施例1と

濃度10 μ g/mlとなるように、発熱物質不含の0.001v/v %ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル（ポリソルベート80）を含む1/15Mリン酸ナトリウム緩衝液に溶かした。pHは7.4とし、終濃度75mMの塩化ナトリウムを加えた。この溶液を実施例1と同一の要領で除菌ろ過し、この溶液から実施例3と同一の要領で凍結乾燥注射剤を調製した。

実施例15) 凍結乾燥注射剤

(Leu²¹) - hEGFを発熱物質不含の0.1v/v %ゼラチンを含む1/15Mリン酸ナトリウム緩衝液に溶かして最終濃度を20 μ g/mlにした。pHは7.4とし、終濃度75mMの塩化ナトリウムを加えた。この溶液を実施例1と同一の要領で除菌ろ過し、この溶液から実施例3と同一の要領で凍結乾燥注射剤を調製した。

実施例16) 凍結乾燥注射剤

(Leu²¹) - hEGFを発熱物質不含の0.001v/v %ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル（ポリソルベート80）を含む

同一の要領で除菌ろ過し、アンプル5mlずつ分注の後、密閉した。

実施例19) 凍結乾燥注射剤

ヒトEGFとヒトTGF β とを、それぞれ最終濃度20 μ g/mlと10 μ g/mlとなるように、発熱物質不含の0.1v/v %ゼラチンを含む1/15Mリン酸ナトリウム緩衝液に溶かした。pHは7.4とし、終濃度75mMの塩化ナトリウムを加えた。この溶液を実施例1と同一の要領で除菌ろ過し、この溶液から実施例3と同一の要領で凍結乾燥注射剤を調製した。

実施例20) 凍結乾燥注射剤

ヒトEGFとヒトTGF β とを、それぞれ最終濃度20 μ g/mlと10 μ g/mlとなるように、発熱物質不含の0.001v/v %ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル（ポリソルベート80）を含む1/15Mリン酸ナトリウム緩衝液に溶かした。pHは7.4とし、終濃度75mMの塩化ナトリウムを加えた。この溶液を実施例1と同一の要領で除菌ろ過し、この溶液を実施例3と同一

一の要領で凍結乾燥注射剤を調製した。

実施例21) 凍結乾燥注射剤

ヒトIGFⅡを発熱物質不含の0.1v/v%のゼラチンを含む1/15Mリン酸ナトリウム緩衝液に溶かして最終濃度を10 μ g/mlにした。pHは7.7とし、終濃度73.6mMの塩化ナトリウムを加えた。この溶液を実施例1と同一の要領で除菌ろ過し、この溶液から実施例3と同一の要領で凍結乾燥注射剤を調製した。

実施例22) 凍結乾燥注射剤

ヒトIGFⅡを発熱物質不含の0.001v/v%のポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル(ポリソルベート80)を含む1/15Mリン酸ナトリウム緩衝液に溶かして、最終濃度を10 μ g/mlにした。pHは7.7とし、終濃度73.6mMの塩化ナトリウムを加えた。この溶液を実施例1と同一の要領で除菌ろ過し、この溶液から実施例3と同一の要領で凍結乾燥注射剤を調製した。

4. 図面の簡単な説明

第1図は、実験例1におけるガン重量の経時変化を示したグラフである。

第2図は、実験例2においてガン重量の経時変化を示したグラフである。

第3図は、実験例3においてガン重量の経時変化を示したグラフである。

第4図は、実験例1において実験動物の体重の経時変化を示したグラフである。

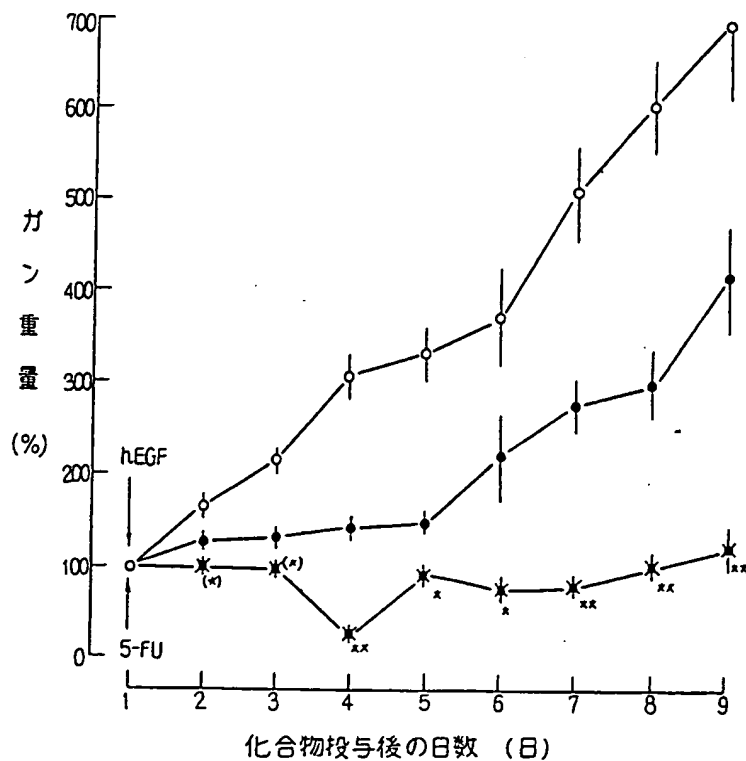
第5図は、実験例8における化合物投与直前(第1日目)に対するガン重量の経時変化を示したグラフである。

第6図は、実験例9における化合物投与直前(第1日目)に対するガン重量の経時変化を示したグラフである。

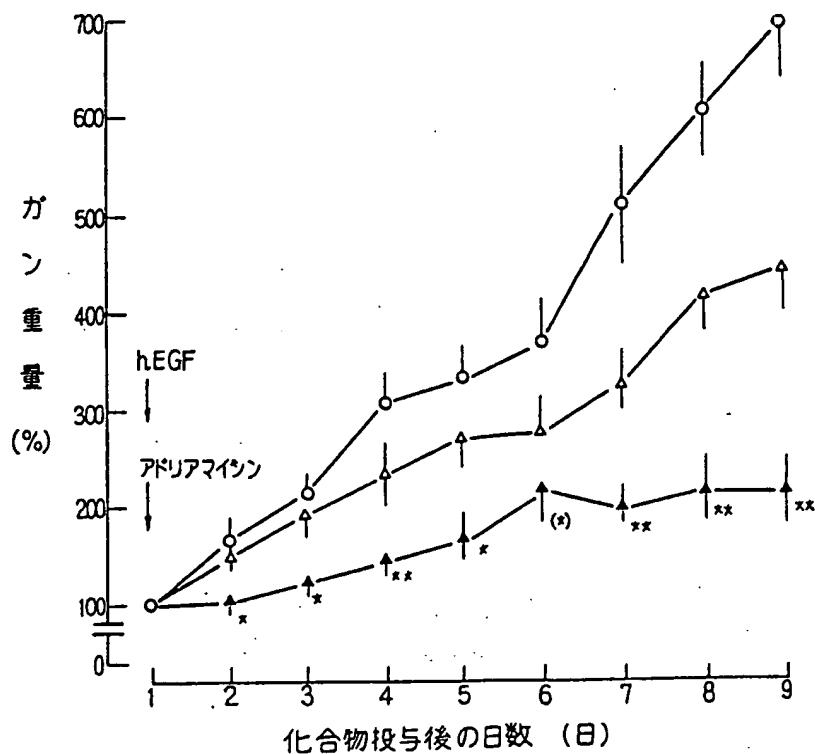
第7図は、実験例10におけるガン重量の経時変化を示したグラフである。

第8図は、実験例13におけるガン重量の経時変化を示したグラフである。

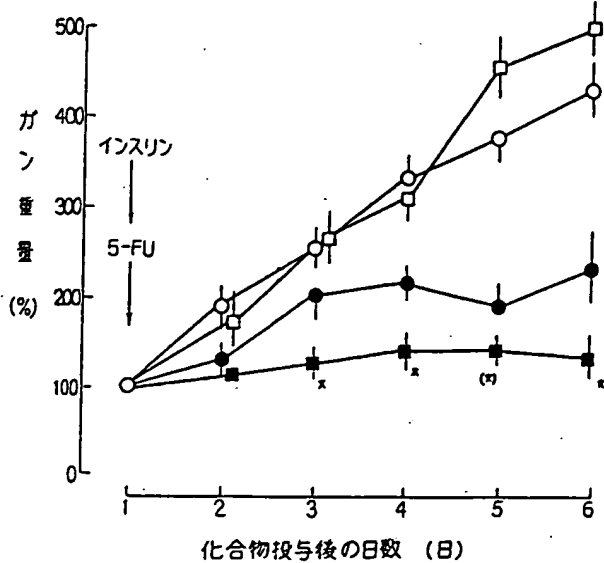
出版人代理人 佐藤 一 雄



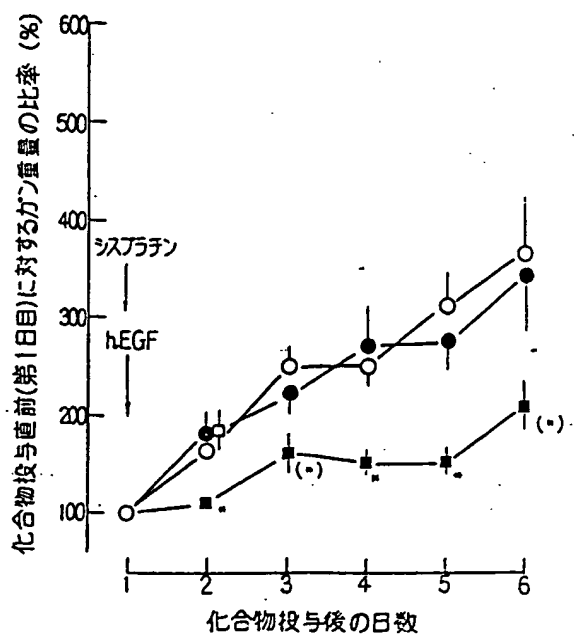
第1図



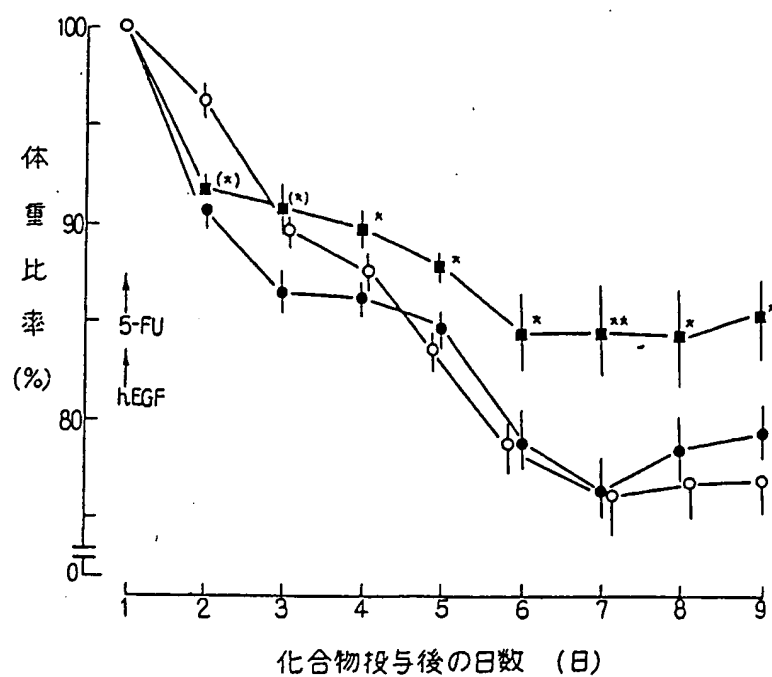
第2図



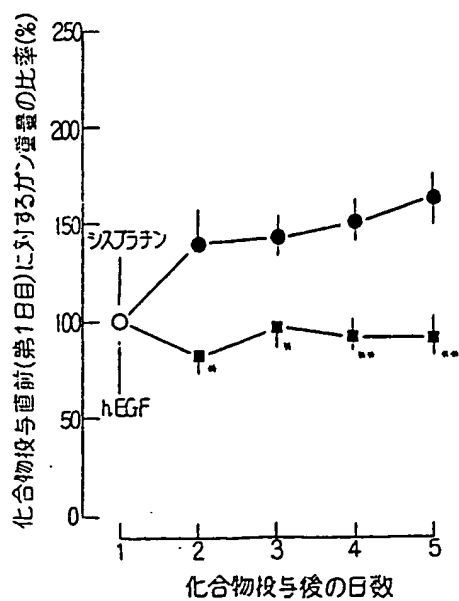
第3図



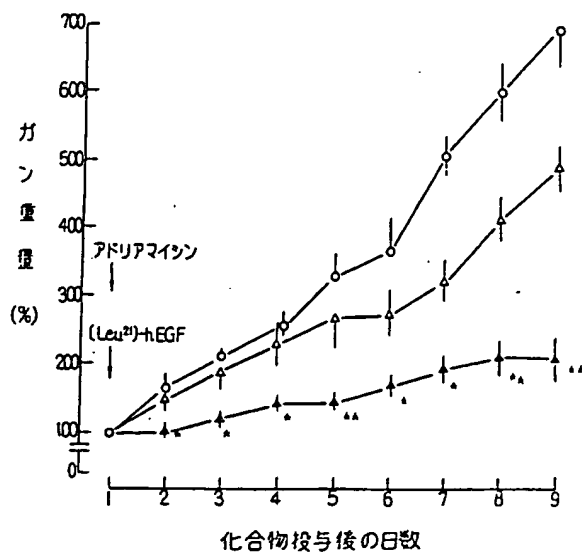
第5図



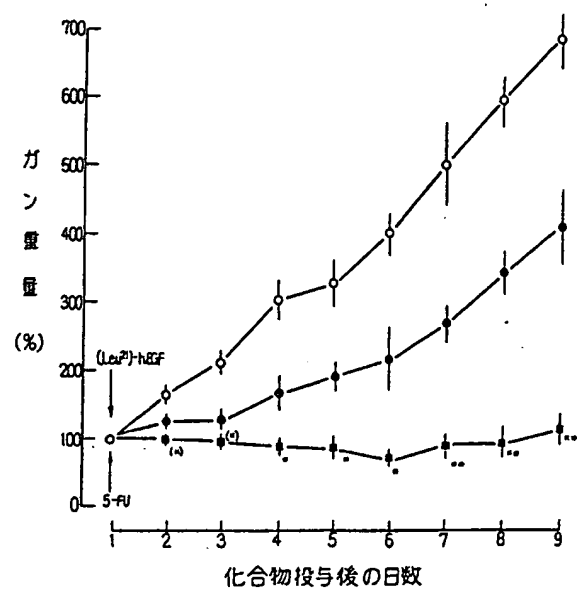
第4図



第6図



第7図



第8図

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.